

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DE LA VIRULENCE DES BACILLES TUBERCULEUX JEUNES

par L. NÈGRE (*).

(*Institut Pasteur.*)

Il est, à l'heure actuelle, à peu près unanimement admis que les bacilles tuberculeux ne sont pas tous acido-résistants dans la première période de leur développement en milieu de culture artificiel. Ce n'est que vers le cinquième à sixième jour après l'ensemencement que les éléments bacillaires d'une colonie ou d'un voile ont tous acquis l'acido-résistance.

Par contre, on a jusqu'à présent peu étudié le pouvoir pathogène des germes qui forment les colonies jeunes de bacilles tuberculeux.

Seul, A. Vaudremer a cru pouvoir établir une relation entre la perte de l'acido-résistance et le degré de la virulence des bacilles. Cet auteur a constaté que dans un milieu pauvre comme l'eau de pomme de terre, le bacille de Koch perd son acido-résistance et subit un affaiblissement de sa virulence. Réensemencé sur les milieux usuels, il récupère son acido-résistance et son pouvoir pathogène initial.

Puisque aucun auteur n'avait, à notre connaissance, étudié la virulence des bacilles tuberculeux dans les premiers jours de leur développement, nous avons effectué en 1930, avec A. Boquet et J. Valtis, une première série de recherches sur cette question.

Nous sommes arrivés à la conclusion que dans les cinq premiers jours de leur développement en voile sur le milieu synthétique de Sauton, les bacilles tuberculeux présentent une virulence

(*) *Société Française de Microbiologie*, 6 février 1947.

notablement inférieure à celle des cultures âgées de trois à quatre semaines.

Comme ces expériences avaient été faites avec la souche Bovine Vallée entretenue depuis longtemps sur les milieux artificiels, nous avons repris ces recherches avec d'autres germes d'origine humaine et bovine, plus récemment isolés et plus virulents, dans le but de contrôler nos premiers résultats.

ETUDE DE LA VIRULENCE DES BACILLES TUBERCULEUX JEUNES
CULTIVÉS EN VOILE SUR MILIEU DE SAÜTON.

Au cours de nos anciennes recherches, nous avons fait des prélèvements de germes à la périphérie du fragment de voileensemencé à la surface du milieu de Sauton, supposant que nous n'enlevions que les bacilles nouvellement formés. Depuis lors, les observations de J. Bretey et J. Browaeys ont établi que les bacilles acido-résistants jeunes prennent naissance dans toute la masse du voile déposé à la surface du liquide. Il n'est donc pas possible de séparer dans ces voiles les germes nouveaux de ceux, plus âgés, qui formaient la semence.

Nous avons pensé que les bacilles jeunes doivent, s'ils sont en quantité suffisante et s'ils ont une virulence inférieure à celle des germes plus évolués, diminuer le pouvoir pathogène des éléments microbiens qui composent l'ensemble du voile par rapport à celui de bacilles de la même souche développés dans des conditions semblables, mais prélevés trois semaines environ après leur ensemencement.

Dans les nouvelles expériences que nous avons entreprises, nous avons procédé de la façon suivante : après avoirensemencé sur milieu de Sauton plusieurs parcelles de voiles de bacilles tuberculeux âgés de huit jours, nous les avons récoltés en entier après trois ou quatre jours de développement. Ces voiles ont été pesés et inoculés à des doses variables sans tenir compte du fait qu'ils contiennent une certaine proportion de germes plus âgés. Dans d'autres expériences, les doses de bacilles inoculés ont été déterminées, non par pesée, mais par numération des germes à l'hématimètre (1).

Nous avons, dans chaque expérience, étudié comparativement la virulence des voiles des mêmes souches développés sur milieu de Sauton et âgés de trois semaines.

Les souches humaines ont été inoculées à des cobayes sous la peau, les souches bovines à des cobayes par la voie sous-cutanée et à des lapins par la voie intraveineuse.

(1) Nous adressons nos remerciements à M. F. VAN DEINSE qui a bien voulu pratiquer ces numérations.

SOUCHES D'ORIGINE HUMAINE.

EXPÉRIENCE I. — 6 cobayes reçoivent en injection sous-cutanée 0,001 mg. de la souche humaine B (voile d'une culture en milieu de Sauton, âgée de quatre jours). 6 autres cobayes reçoivent sous la peau la même dose de bacilles de cette souche (culture âgée de quatorze jours). 1 cobaye meurt prématurément dans chaque lot. Les 10 survivants sont sacrifiés quarante-trois jours après l'inoculation. Les lésions ganglionnaires des cobayes de ces deux lots sont sensiblement équivalentes. Aucun d'eux n'a présenté de lésions sur le foie et sur les poumons. Mais dans le groupe de cobayes inoculés avec la culture de quatorze jours, tous les cobayes présentent un certain nombre de tubercules sur leur rate. Parmi les 5 animaux inoculés avec la culture de quatre jours, 4 présentent une rate normale, 1 seul a un petit tubercule sur cet organe.

EXPÉRIENCE II. — 8 cobayes reçoivent sous la peau de la cuisse droite 1/5.000 de milligramme de la souche humaine 258 (voile sur milieu synthétique de Sauton, culture de vingt et un jours) et 8 autres sont inoculés de la même façon avec une dose semblable de bacilles de cette souche (voile sur milieu synthétique de Sauton, culture de quatre jours). Tous ces animaux sont sacrifiés six semaines après l'inoculation.

Dans les deux groupes, les lésions ganglionnaires ne présentent pas de différences sensibles. Tous les cobayes inoculés avec la culture de vingt-et-un jours ont des tubercules plus ou moins nombreux sur la rate. Par contre, parmi ceux qui ont reçu la culture âgée de quatre jours, 5 cobayes ont cet organe apparemment indemne ; les 3 autres ont des lésions spléniques semblables à celles constatées chez les animaux du groupe précédent.

SOUCHES D'ORIGINE BOVINE.

EXPÉRIENCE III. — 3 cobayes reçoivent sous la peau de la cuisse droite 0,01 mg. d'une souche de type bovin provenant d'un cheval tuberculeux (culture sur milieu synthétique de Sauton âgée de vingt et un jours) et 3 autres la même dose de bacilles de cette souche développés sur ce milieu, mais âgés de trois jours. Tous ces animaux sont sacrifiés trente-huit jours après l'inoculation. Les cobayes du premier groupe (culture de vingt et un jours) ont de gros ganglions inguinaux et sous-lombaires et d'assez nombreux tubercules sur la rate. Parmi les animaux inoculés avec la culture de trois jours, un est mort prématurément d'une infection intercurrente, le second a des lésions ganglionnaires et spléniques aussi prononcées que celles des cobayes inoculés avec la culture de trois semaines. Le troisième a des ganglions inguinaux et sous-lombaires plus petits que ceux du cobaye précédent et n'a pas de lésions sur la rate.

EXPÉRIENCE IV. — 3 cobayes reçoivent sous la peau de la cuisse droite 0,0001 mg. d'une souche de type bovin provenant d'un cheval tuberculeux (culture sur milieu synthétique de Sauton âgée de trois

semaines) et 3 autres la même dose de bacilles de cette souche développés sur ce milieu, mais âgés de trois jours.

Tous ces animaux sont sacrifiés trente-sept jours après l'inoculation. Les animaux du premier groupe (culture de vingt et un jours) ont de gros ganglions inguinaux et sous-lombaires et quelques tubercules sur la rate. Ceux du second lot (culture de trois jours) présentent de petits ganglions inguinaux et sous-lombaires ; leurs rates sont apparemment indemnes de lésions.

EXPÉRIENCE V. — 2 lapins reçoivent dans la veine 0,01 mg. de la souche de type bovin utilisée dans l'expérience précédente (voile sur milieu synthétique de Sauton âgé de vingt et un jours) et 2 autres lapins la même dose de bacilles de cette souche (voile sur le même milieu âgé de trois jours).

Ces animaux sont sacrifiés trente-cinq jours après leur inoculation. Les lapins qui ont reçu la culture de trois semaines présentent des lésions pulmonaires confluentes et quelques tubercules sur les rates toutes hypertrophiées et sur les reins.

Les lapins inoculés avec la culture de trois jours ont sur leurs poumons des tubercules beaucoup moins nombreux que les animaux du groupe précédent ; leurs rates de volume normal et leurs reins sont indemnes de lésions.

EXPÉRIENCE VI. — 6 lapins reçoivent dans la veine 0,001 mg. de la souche bovine 260 (culture sur milieu synthétique de Sauton âgée d'un mois) et 6 autres sont inoculés de la même façon avec 0,001 mg. de la même souche (culture âgée de quatre jours).

Dans chaque lot, 3 lapins meurent prématurément d'infections intercurrentes. Les 3 survivants sont sacrifiés soixante-quatorze jours après l'inoculation.

Les trois survivants du groupe inoculé avec la culture âgée d'un mois présentent, le premier de nombreux gros tubercules sur les poumons et 4 tubercules sur la rate, le second quelques gros tubercules sur les poumons, 4 granulations sur la rate, une granulation sur un rein, le troisième plusieurs gros tubercules sur les poumons, 5 granulations sur la rate et 1 gros tubercule sur le rein droit.

Dans le lot inoculé avec la culture âgée de trois jours, 1 lapin n'a pas de tubercules sur les poumons ni sur les reins, mais 5 petites granulations sur la rate ; le second, quelques granulations sur les poumons, la rate et le foie ; le troisième, 2 tubercules à la base des poumons et à un sommet 1 tubercule entouré de quelques fines granulations ; les autres organes ne présentent pas de lésions.

Il ressort de ces expériences que les cobayes et les lapins inoculés avec les bacilles tuberculeux humains ou bovins de voiles âgés de trois à quatre jours, présentent, en général, des lésions moins prononcées que ceux ayant reçu la même quantité de germes provenant de voiles de quinze à vingt jours. Chez les cobayes, cette différence n'apparaît que chez les animaux inoculés avec des doses faibles de bacilles (0,001 mg. à 0,0001 mg.). Mais, même avec ces quantités minimales de germes, on observe parfois, chez

certains des animaux inoculés avec les bacilles jeunes, des lésions presque aussi importantes que chez ceux ayant reçu des bacilles plus évolués. On peut expliquer ces différences par le fait que les voiles âgés de trois à quatre jours, contenant une certaine quantité de bacilles plus âgés, utilisés pour l'ensemencement, la proportion de ces derniers peut varier dans les diverses parties de la suspension microbienne préparée avec les voiles. Lorsque la proportion des germes ayant servi à l'ensemencement est particulièrement élevée, les effets de la moindre virulence des bacilles jeunes ne peuvent plus se manifester.

Il fallait donc, pour étudier la virulence des bacilles tuberculeux jeunes, utiliser une autre méthode de culture que celle des voiles en surface qui, par le mécanisme de leur développement, ne permettent pas de séparer les germes de formation récente de ceux qui ont servi à l'ensemencement.

ETUDE DE LA VIRULENCE DES BACILLES TUBERCULEUX JEUNES
CULTIVÉS DANS LA PROFONDEUR D'UN MILIEU LIQUIDE
(MILIEU DE BESREDKA).

Abandonnant donc nos recherches sur les voiles, nous avons essayé de suivre le développement du pouvoir pathogène des bacilles tuberculeux d'origine bovine qui sont capables de se multiplier dans la profondeur d'un milieu de culture liquide, comme le milieu à l'œuf de Besredka.

En déposant les bacilles d'ensemencement à la partie inférieure du milieu sans en souiller la masse, et sans secouer le tube, on peut penser que dans les jours suivants la partie supérieure du liquide de culture ne contient que des germes de formation récente. Nous avons utilisé, pour ces recherches, le dispositif suivant :

Le milieu liquide de Besredka a été réparti dans de grands tubes de 22cm. de hauteur et de 2 cm. de diamètre. A travers le coton bouchant l'orifice supérieur du tube, nous avons fait passer un petit tube de verre cylindrique de 7 mm. de diamètre, dont l'extrémité inférieure touche presque le fond du grand tube. L'extrémité supérieure du petit tube, obturée par du coton, dépasse de quelques centimètres celle du tube qui le contient. L'ensemble est stérilisé à l'autoclave.

Pour l'ensemencement, nous nous sommes servis d'une souche bovine cultivée sur milieu de Löwenstein. Trois jours avant le début de l'expérience, quelques centimètres cubes du milieu de Besredka sont introduits dans le tube de Löwenstein de façon que les bacilles ensemencent le liquide. Au bout de trois jours de contact à l'étuve à 37°, on prélève à la pipette 1 centi-cube de ce liquide et on l'introduit par le petit tube dans le fond du grand tube contenant le milieu de Besredka.

Les prélèvements du milieu ainsi ensemencé ont été effectués

COBAYES						
Taux de dilution	Nombre de germes	Délai de mort en jours	I. D. Délai	Lésions		
<i>Deuxième jour</i>						
0,01	10	50	0 (27 j.).	G., petit pois.	Ra., 0.	F., 0.
0,1	10	48	+ (23 j.).	G., petit pois.	Ra., 0.	F., 0.
0,1	10	56	+ (23 j.).	G., pois.	Ra., 3.	F., 0.
<i>Troisième jour</i>						
0,01	80	44	+ (23 j.).	G., gros pois.	Ra., 20.	F., 0.
0,01	80	44	+ (23 j.).	G., gros pois.	Ra., 18.	F., 0.
0,1	80	42	+ (21 j.).	G., gros pois.	Ra., 5.	F., 0.
0,1	80	45	+ (21 j.).	G., pois.	Ra., 3.	F., 0.
<i>Quatrième jour</i>						
0,001	50	43	++ (22 j.).	G., pois.	Ra., 6.	F., 0.
0,001	50	43	E. (22 j.).	G., pois.	Ra., 3.	F., 0.
0,1	60	43	+ (23 j.).	G., pois.	Ra., 10.	F., 0.
0,1	60	51	+ (23 j.).	G., pois.	Ra., 1.	F., qqs.
0,1	60	51	+ (23 j.).	G., haricot.	Ra., hyper.	F., 0.
<i>Sixième jour</i>						
0,001	50	49	++	G., haricot.	Ra., nb.	F., 0.

G., ganglion sous-lombaire; Ra., rate; F., foie, P., poumons; Rel., reins; j., jours; Inc. incomptables; E., gros épaissement; +, intradermoréaction d'intensité moyenne; ++, i

G., ganglion sous-lombaire; Ra., rate; F., foie, P., poumons; Rel., reins; j., jours; Inc. incomptables; E., gros épaississement; +, intradermoréaction d'intensité moyenne; ++, i

les deuxième, troisième, quatrième, cinquième, sixième et vingt et unième jours à mi-hauteur du liquide du grand tube. Par ce dispositif d'ensemencement et par les précautions que nous avons prises, nous pensons n'avoir en général prélevé dans la moitié supérieure du milieu de culture que les bacilles tuberculeux nouvellement formés à la suite de l'ensemencement. En effet, dans les deux ou trois premiers jours après l'ensemencement, on ne voit, dans la moitié supérieure du liquide de culture, que certains petits amas de bacilles cyanophiles ou des germes dont le plus souvent l'acido-résistance paraît incomplète.

Les bacilles nouveaux qui se développent dans la partie supérieure du liquide ensemencé sont trop peu nombreux pour qu'on puisse les recueillir par centrifugation et les peser. Au lieu de compter les germes à l'hématimètre, nous avons préféré ense-

à 100 bacilles.

LAPINS							
x	Nombre de germes	Délai de mort en jours	Élévation thermique Délai	Lésions			
Ensemencement :							
	10	53	+ 1°3 (50 j.).	P., 0.	Ra., 0.	F., 0.	Rei., 0.
	10	53	+ 1° (50 j.).	P., 0.	Ra., 0.	F., 0.	Rei., 0.
	40	49	+ 1°4 (23 j.).	P., 3.	Ra., 4.	F., 0.	Rei., 0.
	40	93	+ 0°4 (23 j.).	P., 5.	Ra., 1.	F., 0.	Rei., 0.
Ensemencement :							
	20	42	+ 1°3 (21 j.).	P., 2.	Ra., 5.	F., 0.	Rei., 0.
	80	42	+ 2°7 (31 j.).	P., 15.	Ra. et F., nb. fins t.		Rei., 1.
	80	45	+ 2° (31 j.).	P., 12.	Ra., nb.	F., 0.	Rei., 0.
Ensemencement :							
11	50	43	+ 2°1 (22 j.).	P., 0.	Ra., 0.	F., 0.	Rei., 0.
11	50	43	+ 2°7 (22 j.).	P., 0.	Ra., 2.	F., 0.	Rei., 0.
	60	42	+ 1°8 (41 j.).	P., 25.	Ra., qqs.	F., qqs.	Rei., 1.
	60	51	+ 1°3 (41 j.).	P., 3.	Ra., nb.	F., 3.	Rei., 2.
Ensemencement :							
0001	30	36	+ 1°9 (15 j.).	P., nb.	Ra., 1.	F., nb.	Rei., 0.
0001	100	36	+ 2°6 (15 j.).	P., nb.	Ra., nb.	F., 0.	Rei., 0.
0001	100	36	+ 1°8 (15 j.).	P., 2.	Ra., 20.	F., 2.	Rei., 0.

n d'intensité forte; hyper., hypertrophiée; qqs, quelques tubercules; nb., nombreux tubercules; très nombreux tubercules; t. conf., tubercules confluent; nb. fins t., nombreux fins tubercules.

mencer sur milieu de Löwenstein des dilutions à des taux variables du liquide de culture et dénombrer les colonies développées au bout d'un mois. L'ensemencement étant fait avec 0,1 cm³ de la dilution, il suffisait de multiplier par 10 le nombre des colonies observées pour avoir celui des germes contenus dans 1 cm³ de la dilution du liquide de culture, qui était inoculé aux cobayes sous la peau et aux lapins dans la veine.

En comparant chez ces animaux les lésions provoquées par un nombre sensiblement équivalent de germes, nous avons pu apprécier les différences qui existent au point de vue de leur pouvoir pathogène entre les bacilles tuberculeux de formation récente (trois ou quatre jours) et ceux plus âgés (six jours et vingt et un jours).

Les cobayes inoculés ont été éprouvés par injection intrader-

TABLEAU II. — Incu

COBAYES						
Taux de dilution	Nombre de germes	Délai de mort en jours	i. D. Délai	Lésions		
Quatrième jour						
0,01	490	30	+ (22 j.).	G., pois.	Ra., 0.	F., 0.
		30	+ (22 j.).	G., pois.	Ra., hyper.	F., 0.
Vingt et un jours						
0,001	150	49		G., haricot.	Rei., t. conf.	F., nb. fins

TABLEAU III. — Incu

COBAYES						
Taux de dilution	Nombre de germes	Délai de mort en jours	I. D. Délai	Lésions		
<i>Troisième jour</i>						
1/5	Inc.	45	+ (24 j.).	G., gros haricot.	Ra., 5.	F., 0. P.,
1/5	Inc.	48	++ (24 j.).	G., pois.	Ra., hyper., 0.	F., 0. P.,
1/5	Inc.	52	+ (24 j.).	G., gros pois.	Ra., qqs.	F., qqs. P.,
1/5	Inc.	52	++ (24 j.).	G., haricot.	Ra., hyper., 0.	F., qqs. P.,
<i>Quatrième jour</i>						
0,1	Inc.	43	+ (22 j.).	G., pois.	Ra., 3.	F., 0. P.,
0,1	Inc.	43	+ (22 j.).	G., petit pois.	Ra., qqs.	F., 0. P.,
0,1	Inc.	43	+ (22 j.).	G., noisette.	Ra., nb.	F., 0. P.,
<i>Sixième jour</i>						
0,1	Inc.	45	+ (23 j.).	G., pois.	Ra., nb.	F., 0. P.,
0,1	Inc.	45	+ (23 j.).	G., gros pois.	Ra., nb.	F., qqs. P.,
<i>Vingt et un jours</i>						
0,01	Inc.	49		G., petit pois.	Ra., nb.	F., 0. P.,
0,01	Inc.	49		G., pois.	Ra., t. nb.	F., nb. P.,

à 500 bacilles.

LAPINS				
	Nombre de germes	Délai de mort en jours	Élévation thermique Délai	Lésions
Placement :				
Insemencement :				
1	150	49		P., t. nb. Ra., qqs. F., 2. Rei., 1.

à 500 germes.

LAPINS				
	Nombre de germes	Délai de mort en jours	Élévation thermique Délai	Lésions
Placement :				
	Inc.	41	+ 2°3 (24 j.).	P., qqs. Ra., 10. F., 0. Rei., 1.
	Inc.	43	+ 1°6 (24 j.).	P., 20. Ra., 15. F., 0. Rei., 2.
	Inc.	52	+ 2°1 (24 j.).	P., 4. Ra., 10. F., 2. Rei., 2.
Insemencement :				
	Inc.	42	+ 1° (22 j.).	P., qqs. Ra., qqs. F., 0. Rei., 0.
Placement :				
1	Inc.	36	+ 2°1 (15 j.).	P., t. nb. Ra., t. nb. F., t. nb. Rei., t. nb.
1	Inc.	36	+ 2° (15 j.).	P., t. nb. Ra., t. nb. F., t. nb. Rei., t. nb.
	Inc.	46		P., nb. Ra., nb. F., qqs. Rei., 4.
	Inc.	46		P., nb. Ra., nb. F., qqs. Rei., 1.
	Inc.	46		P., nb. Ra., qqs. F., qqs. Rei., 0.
	Inc.	46		P., nb. Ra., 10. F., qqs. Rei., 1.
Insemencement :				
	Inc.	49		Tuberculose généralisée.
	Inc.	49		Tuberculose généralisée.

mique de 0,1 cm³ de tuberculine brute diluée au 1/10 ; les lapins par injection intraveineuse de 1/20 cm³ de tuberculine brute. Ces derniers ont été observés au point de vue de leur réaction thermique quatre heures après cette injection.

Pour mieux mettre en évidence les résultats que nous avons obtenus, nous avons groupé tous nos protocoles d'expériences dans les tableaux suivants d'après le nombre des bacilles inoculés aux animaux.

Groupe I : 1 à 10 colonies = 10 à 100 germes.

Groupe II : 10 à 50 colonies = 100 à 500 germes.

Groupe III : plus de 50 colonies = plus de 500 germes.

Le seul facteur variable est, dans chacun de ces groupes, l'âge des bacilles, puisque le nombre des germes inoculés a été sensiblement le même. Il est donc certain que les différences observées dans les lésions des animaux inoculés ne peuvent être dues qu'aux variations de virulence des bacilles tuberculeux à leurs divers stades de développement.

Nos expériences montrent qu'avec un nombre à peu près égal de germes, il y a en général beaucoup moins de lésions chez les cobayes et les lapins inoculés avec les bacilles âgés de trois ou quatre jours que chez ceux ayant reçu les bacilles prélevés le vingt et unième jour après leur ensemencement.

Lorsque l'infection a été réalisée par un petit nombre de germes (moins de 100), les différences observées au point de vue des lésions de ces deux groupes d'animaux sont peu apparentes comme il s'agit d'une infection paucibacillaire.

Pour avoir des résultats plus nets, il faut effectuer l'inoculation des animaux avec au moins 100 à 500 bacilles et encore mieux avec plus de 500 germes.

Chez les cobayes et les lapins inoculés avec ce nombre de germes (bacilles âgés de trois ou quatre jours), les organes n'ont que de très rares tubercules ou en sont apparemment indemnes, bien que les cobayes présentent souvent des lésions ganglionnaires importantes, comme nous l'avons observé avec A. Boquet et J. Valtis après l'inoculation de voiles jeunes.

Par contre, les animaux inoculés avec le même nombre de bacilles plus âgés (six jours) et sacrifiés dans les mêmes délais, ont de nombreux tubercules sur leurs divers organes. Leurs lésions sont donc beaucoup plus importantes que celles provoquées par les bacilles de trois ou quatre jours mais ne sont pas aussi prononcées que celles des animaux inoculés avec des bacilles de vingt et un jours. Chez ces derniers on trouve des tubercules souvent confluent et généralisés à tous les organes. Les bacilles jeunes commencent donc à acquérir leur virulence normale à partir du sixième jour.

CONCLUSIONS.

L'étude de la virulence des voiles jeunes de diverses souches de bacilles tuberculeux d'origine humaine et bovine développés sur le milieu synthétique de Sauton nous a permis de confirmer les résultats que nous avons obtenus avec A. Boquet et J. Valtis en employant la souche bovine Vallée.

Les cobayes et les lapins qui ont reçu par la voie sous-cutanée ou intraveineuse des doses modérées (1/1.000 à 1/5.000 de milligramme) de germes qui composent ces voiles au troisième ou au quatrième jour de leur développement présentent des lésions moins prononcées que ceux inoculés avec des quantités égales de bacilles âgés de trois semaines. Mais par le fait que ces voiles contiennent aussi un certain nombre de germes plus âgés qui ont servi à l'ensemencement, les résultats ont une certaine irrégularité.

Pour éviter cette cause d'erreur, nous avons étudié le pouvoir pathogène d'une souche de bacilles tuberculeux d'origine bovine cultivée en milieu liquide de Besredka en prélevant les germes nouvellement formés dans la partie supérieure du liquide semencé au fond du tube. Nous avons comparé chez le cobaye et le lapin les lésions provoquées par un nombre sensiblement équivalent de bacilles prélevés aux deuxième, troisième, quatrième, cinquième, sixième et vingt et unième jour après l'ensemencement.

Dans ces expériences plus exactes que les précédentes, puisque le seul facteur variable était l'âge des bacilles, nous avons obtenu les mêmes résultats.

Lorsqu'on inocule à des cobayes par la voie sous-cutanée ou à des lapins par la voie veineuse un nombre suffisamment élevé de germes (au moins 100 à 500 et mieux plus de 500) pour éviter les effets d'une infection par trop paucibacillaire, on constate que les bacilles tuberculeux âgés de trois ou quatre jours ont un pouvoir pathogène beaucoup moins prononcé que celui des bacilles plus âgés.

Le pouvoir pathogène qui caractérise une souche déterminée cultivée en milieu artificiel commence à apparaître vers le sixième jour après son ensemencement. On peut remarquer que la période pendant laquelle les bacilles tuberculeux ont une virulence atténuée coïncide avec celle durant laquelle la plupart des bacilles nouvellement formés n'ont pas encore acquis leur acido-résistance complète.

BIBLIOGRAPHIE

- BEZANÇON (F.) et PHILIBERT (A.). *Soc. études scient. sur la tuberculose*, 12 mars 1914, 32.
BRETEY (J.) et BROWAEYS (J.). *Ces Annales*, 1945, 71, 331.

- LEGROUX (A.) et MAGROU (J.). *Ces Annales*, **84**, 417.
- MARMOREK. *Bull Acad. Méd. Paris*, 1903, **50**, 332, 465, 480 ; *Berl. Méd. Klin.* 1906, **3**, 58 ; *Berl. Klin. Woch.*, 1907, **44**, 18.
- NEGRE (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **146**, 936.
- NEGRE (L.), BOQUET (A.) et VALTIS (J.). *C. R. Soc. Biol.* 1928, **99**, 45 ; 1929, **101**, 541 ; *Ces Annales*, 1930, **44**, 247.
- VAUDREMER (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, 259, 775 ; **85**, 1055.

SUR L'UTILISATION DE L'AZOTE NITRIQUE PAR LES BACTÉRIES DU GENRE *BACILLUS*

par M. LEMOIGNE, R. GAVARD, M^{me} M. CROSON et M^{ll} M. LE TREIS (*).

(Service des Fermentations de l'Institut Pasteur.)

Des bactéries aérobies du genre *Bacillus* utilisent, pour la plupart, les nitrates comme seul aliment azoté. En vue d'études ultérieures sur la réduction de l'azote nitrique, nous pensons qu'il est utile de coordonner et de préciser nos connaissances sur la manière dont ces bacilles assimilent l'azote nitrique. A ce point de vue il existe 2 types extrêmes : nous avons choisi pour les représenter, deux bactéries faciles à cultiver en un milieu minéral, glucosé ou saccharosé, avec NO^3K ou NO^3Na comme seule source d'azote.

L'une d'elles est voisine de *Bacillus mesentericus* et nous la désignerons « Bacille G », l'autre est *Bacillus megatherium*.

MILIEU. — Nous en avons décrit déjà la préparation [1]. Nous en rappellons la composition :

Solution A :

PO^4KH^2	5 g.
$\text{SO}^4\text{MG } 7\text{H}^2\text{O}$	0,15 g.
SO^4Mn	0,03 g.
Citrate de fer.	0,03 g.
NO^3K	10 g.
ou NO^3Na	8,5 g.
Eau de source	Q. S. 800 cm ³ .

Solution B :

Glucose.	30 g.
Eau bidistillée pour (<i>B. megatherium</i>)	200 cm ³ .
Saccharose	30 g.
Eau bidistillée pour (<i>bacille G</i>)	200 cm ³ .

Ces deux solutions sont stérilisées séparément.

Pour l'ensemencement, on émulsionne une culture sur gélose de vingt-quatre heures issue elle-même de spores. Cette émulsion, homogénéisée par agitation avec des billes de verre stériles, est décantée dans la solution de glucose. Les solutions A et B sont réunies. Le mélange est réparti par 50, 200 et surtout 100 cm³ dans des flacons d'Erlenmeyer de 1 litre stériles. Ces flacons sont

(*) Société Française de Microbiologie, 6 mars 1947.

agités pendant tout le temps de la culture à 31° (amplitude du mouvement 5 cm., nombre d'oscillations à la minute : 90).

La méthode ordinaire qui consiste à compléter à un volume déterminé, à centrifuger et à faire tous les dosages des produits solubles sur une partie aliquote du liquide clair, n'est utilisable que lorsque le volume des corps microbiens est faible. Or, dans ces conditions de culture, la masse microbienne est très importante et la méthode qui la néglige est en défaut.

Le mieux serait de centrifuger et de compléter le liquide clair avec les eaux de lavage à un volume connu. Mais ces lavages sont très longs. Nous avons employé une technique plus simple et qui donne des résultats satisfaisants. On opère comme d'habitude en centrifugeant la culture après l'avoir amené à un volume connu, mais on détermine le volume occupé par les microbes et on en tient compte dans les calculs.

POIDS DES MICROBES SECS. — Dans le cas du *Bacillus megatherium* les microbes sont émulsionnés dans l'eau et amenés à un volume connu. Toutes les déterminations concernant les corps microbiens se font sur une partie aliquote de cette émulsion suivant les méthodes déjà décrites.

Mais le « *Bacille G* » ne donne pas une émulsion homogène. Nous avons donc modifié la technique. La masse microbienne humide est pesée, malaxée avec soin avec un agitateur, et on en prélève un poids connu. Cette pâte est évaporée au bain-marie, desséchée à 100-105° jusqu'à poids constant.

AZOTE ORGANIQUE DES CORPS MICROBIENS. — Dans tous les cas on fait un micro Kjeldahl. Dans le cas du *B. megatherium*, on opère sur une partie aliquote de l'émulsion microbienne.

Avec le « *Bacille G* », un poids connu de la pâte de bacilles (1 g. environ) est délayé dans 5 cm³ de SO₄H₂ concentré, puis malaxé. On obtient une dissolution très rapide. On reprend par l'eau et l'on amène à 50 cm³ avec de l'eau distillée. L'azote est déterminé sur une partie aliquote.

Tous les dosages des produits solubles sont faits sur des portions aliquotes des liquides de culture.

AZOTE NITRIQUE. — On a employé soit la méthode de Muntz soit la méthode de Devarda.

AZOTE NITREUX. — Méthode de Griess.

AZOTE AMMONIACAL. — On entraîne l'ammoniaque par la vapeur d'eau dans un micro Kjeldahl, après avoir alcalinisé le liquide par un peu de magnésie. Dans ces essais, nous n'avons pris aucune précaution pour éviter les pertes d'ammoniaque qui se pro-

duisent nécessairement surtout dans les cultures âgées qui deviennent alcalines.

Mais de nombreux essais nous ont montré que, tout au moins dans les cultures jeunes, il n'y a pas de perte d'azote libre, et que tout l'azote qui n'est pas à l'état d'azote nitreux ou organique est sous forme d'azote ammoniacal.

L'hydroxylamine, quand elle se forme, n'est qu'à l'état de traces. On peut donc déterminer l'ammoniaque par différence. Quand l'autolyse se produit, il peut y avoir, à côté de l'ammoniaque, formation de matières azotées solubles.

I. — RÉSULTATS OBTENUS AVEC LE « BACILLE G ».

Tous les essais faits avec ce bacille nous ont donné des résultats analogues, aussi nous nous contentons d'en exposer deux seulement.

Tous les résultats sont exprimés en milligrammes pour 100 cm³ de milieu initial.

TABLEAU I.

DURÉE en heures	EXAMEN (1) microscopique	N nitrique	N nitrique disparu	N nitreux	N ammoniacal	N organique des bacilles
<i>Essai 101. N nitrique initial, 136 :</i>						
21 . . .	B	20	116	17	60	34
29 . . .	B	0	136	5	92	40
45 . . .	B	0	136	0	87	49
70 . . .	B	0	136	0	80	47
118 . . .	S, S	0	136	0	(105)	31
<i>Essai 206. N nitrique initial, 319 :</i>						
54 . . .	B	204	115	0	(82)	33
77 . . .	B	161	158	0,5	(104)	54
200 . . .	S	143	176	30	(125)	21

(1) Examen microscopique : B, bacilles ; S, spores incluses ; S, spores.

Les résultats sont reportés sur le graphique ci-après.

Après un temps de latence, l'azote organique des microbes augmente rapidement pour atteindre un maximum d'environ 50 mg. pour 100 cm³ de milieu. Puis après la sporulation, l'autolyse se produit avec diminution lente d'azote organique. C'est la courbe classique.

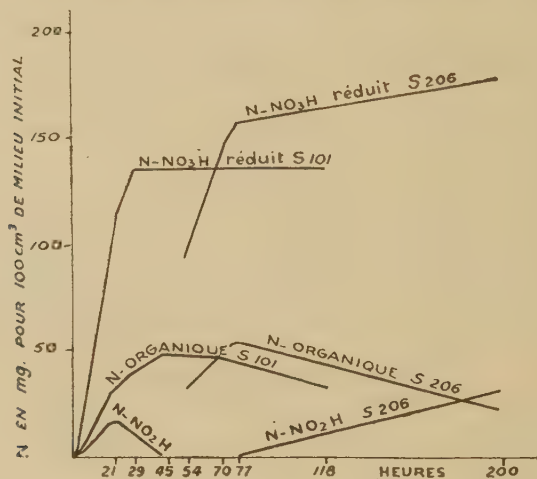
Dans la première période, celle du développement, la réduction du nitrate est rapide et peut être totale si la teneur du milieu ne dépasse pas environ 140 à 150 mg. d'azote nitrique pour 100 cm³.

Dans les solutions plus concentrées, la réduction se poursuit même après autolyse, comme le montre l'essai 206. A la fin de l'expérience, il reste encore de l'azote nitrique et il est probable que la valeur de 176 mg. pour l'azote nitrique disparu n'est pas un maximum mais aurait pu être plus élevée si l'expérience avait duré plus longtemps.

Ainsi que le montrent ces résultats, l'azote nitrique réduit excède toujours l'azote organique formé.

Cet excédent est transformé en azote nitreux, hydroxylaminique et ammoniacal.

L'acide nitreux apparaît toujours au début, pour atteindre un



maximum entre vingt et vingt-quatre heures, maximum très bref que sa brièveté même empêche de déterminer avec précision. Dans un essai nous avons trouvé 33 mg. après vingt-trois heures. Puis très vite, dans ces cultures agitées, très aérées, l'acide nitreux disparaît. Sa disparition est définitive si tout l'azote nitrique a été réduit avant la sporulation. Au contraire si au moment de l'autolyse, il y a encore du nitrate, celui-ci est réduit comme nous l'avons vu mais reste à l'état d'acide nitreux qui s'accumule.

Nous n'avons recherché l'hydroxylamine qu'exceptionnellement. Nous en avons trouvé mais à l'état de traces indosables.

Quand à l'azote ammoniacal, il augmente rapidement. Lors de l'autolyse, l'ammoniaque se forme également aux dépens de l'azote organique.

Cette marche de l'utilisation de l'azote nitrique est tout à fait analogue à celle que l'un de nous a observée autrefois avec *B. subtilis* [2].

La réduction de l'acide nitrique est toujours plus rapide que la formation de l'azote organique. Nous avons calculé le rapport de l'azote nitrique réduit à l'azote organique microbien formé.

Mais pour que ce rapport garde une signification, il faut faire les réserves suivantes : tout d'abord il est certain qu'il n'en a aucune quand la quantité initiale de nitrate est trop faible et que l'azote nitrique disparaît avant la fin du développement.

D'autre part, ce rapport perd également toute signification quand l'autolyse se produit, puisqu'il croît alors, non seulement par augmentation du nitrate réduit, mais encore par diminution de l'azote organique.

Nous avons tenu compte de ces réserves pour établir le tableau II.

En période de croissance, le « *Bacille G* » réduit de 2,67 à 3,48 fois plus d'azote nitrique qu'il ne lui en faut pour la synthèse de ses protides.

Nous nous sommes demandé si ce rapport est fixe ou dépend des conditions expérimentales.

TABLEAU II.

NUMÉRO de l'essai	DURÉE de l'essai	EN MILLIGRAMMES DE N pour 100 cm ³			RAPPORT $\frac{\text{N nitrique disparu}}{\text{N organique formé}}$
		Nitrique au début	Nitrique disparu	Organique formé	
124	23	105	56	21	2,67
	34		105	41	2,63
140	38	117	102	39	2,61
156	48	128	102	40	2,75
	72		118	41	2,88
111	21	136	116	34	3,41
	29		126	40	3,40
209	54	319	115	33	3,48
	77		158	54	2,92

Un essai comparatif, fait entre une culture en surface et une culture agitée, nous montre que ce rapport dépend de l'aération.

Alors qu'en culture agitée nous arrivons à des valeurs normales pour ce rapport, nous trouvons une valeur plus élevée (5,65) dans le cas de la culture en surface, moins aérée.

Cette différence devient beaucoup plus grande si l'on compare les cultures en milieu agité très aéré et les cultures en milieu anaérobie [3].

TABLEAU III. — Essai 101. En milligrammes
pour 100 cm³ de milieu. N nitrique initial : 132.

	CULTURES EN MILIEU AGITÉ		CULTURES EN SURFACE	
Heures	47	71	47	71
N nitrique réduit	129	132	108	119
N organique formé	41	43	19	32
Microbes secs	500	574	235	332
N nitrique réduit				
N organique formé	3,15	3,06	5,65	3,90

Dans un premier essai, nous faisons agir sur le nitrate des bacilles lavés sommairement pour éliminer le milieu de culture et homogénéisés dans un milieu minéral nitraté glucosé, tamponné avec du phosphate de potassium M/5, à pH 7,3. Cette émulsion est répartie par 100 cm³, soit dans des flacons d'Erlenmeyer de 1 litre qui sont agités pendant toute l'expérience, soit dans des ballons de 120 cm³ bouchés à l'émeri et dans lesquels on remplace l'atmosphère d'air par de l'azote privé d'oxygène.

Les flacons et les ballons sont maintenus à l'étuve à 31°. Toutes ces manipulations ont été faites avec les précautions habituelles pour éviter une contamination et on a vérifié à la fin de l'essai la pureté bactériologique des milieux.

TABLEAU IV. — Essai 140. En milligrammes
pour 100 cm³ de milieu initial. N nitrique initial : 117.

		AÉROBIOSE	ANAÉROBIOSE
Durée en heures	0	38	38
N nitrique	117	15	10
N nitrique réduit		102	107
N organique des bacilles	4	43	12
N organique des bacilles formés		39	8
N nitreux	0	1	75
N ammoniacal	0	60	18
Nn/No		2,61	12,6

Nous voyons que dans les 2 cas la réduction du nitrate a été identique : en aérobiose, il y a eu une culture abondante, et le rapport de l'azote nitrique réduit sur l'azote organique formé est normal. Au contraire, en anaérobiose, le développement microbien est presque nul, mais la réduction est identique. Aussi le même rapport atteint-il une valeur tout à fait différente qui est de 12,6. Mais la réduction s'arrête au stade ammoniacal et surtout nitreux.

Nous avons refait la même expérience sous une autre forme.

Nous avonsensemencé un milieu minéral saccharosé contenant 128 mg. d'azote nitrique pour 100 cm³. Comme précédemment, on cultivait en aérobiose et en anaérobiose. Les résultats sont donnés dans le tableau V.

TABLEAU V. — Essai 156.

	AÉROBIOSE			ANAÉROBIOSE		
	48	72	120	48	72	120
Durée en heures	48	72	120	48	72	120
Microbes secs	407	481	187	61	63	20
N nitrique	26	10	2	48	28	3
N nitrique réduit	102	118	126	80	100	125
N organique des bacilles	40	41	29	3	3	1,2
N nitreux	0	3	6	58	57	62
N nitrique réduit						
N organique formé	2,75	2,88		26,66	33,33	

Les cultures en aérobiose sont normales.

En anaérobiose, le développement est presque nul : il n'y a que 3 mg. d'azote organique. Cependant la réduction du nitrate est très élevée, et continue, alors même qu'il y a autolyse et devient pour ainsi dire totale. Aussi le rapport envisagé est-il très élevé, atteignant 33.

Il y a lieu de se demander si le léger développement observé ne tient pas à des traces d'oxygène restant dans l'azote. Mais ce qu'il convient de remarquer c'est que, sans oxygène, le développement s'arrête malgré le rôle que le nitrate a joué comme accepteur d'hydrogène. C'est là une question que nous reprendrons ultérieurement. Mais il résulte de ces essais, qu'en l'absence d'oxygène, l'azote nitrique se transforme en azote nitreux et azote ammoniacal qui s'accumulent dans le milieu.

En résumé, en aérobiose, le pouvoir réducteur de ce microbe, vis-à-vis des nitrates, est environ trois fois plus élevé que son pouvoir de formation d'azote organique.

En anaérobiose, ce rapport augmente considérablement non par augmentation du pouvoir réducteur qui reste constant, mais par diminution et même disparition du pouvoir de synthèse des protéines. L'oxygène du nitrate ne peut remplacer l'oxygène de l'air.

D'autre part nous avons montré antérieurement que le système permettant la réduction anaérobie des nitrates par ce bacille peut être scindé en deux fractions inactives dont le mélange est actif [4].

II. — RÉSULTATS OBTENUS AVEC *Bacillus megatherium*.

Un certain nombre de résultats ont été réunis dans le tableau VI. Comme nous l'avions déjà signalé, *B. megatherium*, dont l'évo-

TABLEAU VI. — Les résultats sont exprimés en milligrammes pour 100 cm³ de milieu initial.

NUMÉRO DE L'ESSAI	EXAMEN microscopique (1)	DURÉE en heures	N nitrique	N nitrique disparu	N nitreux	N ammoniacal	N organique des bacilles
173 a	B, s s, S	17,30 40	46 38	77 85	0 0	0	75 38
169 a	B S	17,30 42	26 24	100 102	0 Traces.		103 45
178 a	B	Env. 16	66	54	0	0	49
188 b	B B B + S S	16,30 22,30 40 70	128 89 64	12 51 76	0 0 0 0	2 0 2 14	9 50 60 28
184 c	B B, S	16,30 64	109 78	33 64	0 0	0 4	32 46

(1) Cultures agitées faites dans des flacons d'Erlenmeyer de 1 litre contenant : a, 50 cm³ de milieu; b, 100 cm³ de milieu; c, 200 cm³ de milieu.

lution est très rapide, assimile très bien l'azote nitrique. La quantité d'azote organique des corps microbiens formée dépasse nettement celle que l'on obtient avec le « *Bacille G* ».

Dans les conditions normales de culture, il n'y a jamais accumulation de nitrite et on en trouve exceptionnellement des traces indosables correspondant à moins de 1 γ par litre.

L'ammoniaque n'apparaît jamais, si ce n'est à l'état de traces, au cours du développement et elle ne se forme qu'à la sporulation, lors de l'autolyse.

L'utilisation de ces deux produits intermédiaires pour la synthèse des protides est donc plus rapide que leur formation.

Nous avons, comme avec le « *Bacille G* », calculé le rapport azote nitrique réduit sur azote organique microbien formé.

Le tableau VII donne les résultats :

Avec « *Bacille G* », ce rapport était aux environs de 3. Ici il est égal à 1. Il y a donc une très nette différence entre les deux bacilles.

Cette différence peut être mise en évidence également par essais en anaérobiose.

ESSAI 204. — Cet essai est fait avec des bacilles jeunes. On cultive dans un vase de Kluver, le milieu étant constamment agité

TABLEAU VII.

NUMÉRO DE L'ESSAI	N nitrique disparu	N organique des microbes	RAPPORT
173.	77	75	1,02
169.	100	103	0,97
178.	54	49	1,1
184.	33	32	1,03
188.	51	50	1,02

et aéré par un courant d'air. Après vingt-trois heures à 31°, 100 cm³ de cette culture sont transvasés dans un ballon bouché à l'émeri. D'autre part, 100 cm³ sont centrifugés.

La masse microbienne est lavée deux fois dans l'eau stérile et remise en suspension dans le milieu minéral glucosé nitraté ordinaire, dans un ballon bouché à l'émeri.

On fait le vide dans les deux ballons, puis on y laisse rentrer de l'azote privé d'oxygène.

Après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 31°, on a recherché la présence de l'acide nitreux par le réactif de Griess. Avec les deux ballons, les résultats ont été négatifs.

Cet essai a été fait également avec des bacilles plus âgés (cinquante-cinq heures), déjà sporulés, donc au début de la phase d'autolyse. Les résultats ont été également négatifs.

Le *B. megatherium* ne réduit le nitrate que dans la mesure exacte où il le transforme en protéine. L'anaérobiose ne permet pas de faire apparaître l'azote nitreux.

CONCLUSIONS.

Ces deux bacilles, comme presque tous les bacilles, utilisent l'azote nitrique comme seul aliment azoté.

Avec le « *Bacille G* », en aérobiose, la réduction du nitrate est environ trois fois plus rapide que son utilisation pour la synthèse des protéines : l'excès d'azote réduit s'accumule dans le milieu soit sous forme nitreuse, pendant une courte période et en une faible mesure, soit surtout sous forme ammoniacale.

En anaérobiose, la transformation en protéine est inhibée et l'azote réduit s'accumule à l'état d'ammoniaque mais surtout de nitrite.

Le système enzymatique permettant la réduction des nitrates est donc facile à mettre en évidence, en aérobiose comme en anaérobiose.

Au contraire, avec *B. megatherium* en aérobiose la réduction

du nitrate n'est pas plus rapide que son utilisation et il n'y a accumulation ni de nitrites ni d'ammoniaque.

En anaérobiose, la réduction du nitrate est inhibée comme la synthèse des protides. Le système enzymatique permettant la réduction des nitrates ne peut pas être caractérisé par la formation de produits intermédiaires, aussi bien en présence qu'en absence de l'oxygène de l'air.

Si les dosages de l'azote nitrique et de l'azote organique ne prouvaient pas qu'il y a eu réellement réduction, en cas d'aérobiose, on serait en droit de conclure que *Bacillus megatherium* ne réduit pas les nitrates. C'est la conclusion des bactériologistes.

Ce fait est intéressant à rapprocher du cas des tissus des végétaux supérieurs. Les sucres ou les pulpes que l'on obtient ne permettent pas en général de mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites. On en a conclu, en général, que cette réduction est due, non à un système enzymatique analogue à celui des champignons et des microbes, mais à une réaction photochimique.

Si les expériences d'Hans Burström [5] apportent des arguments sérieux à cette théorie, le cas du *B. megatherium*, par contre, permet de ne tenir aucun compte des résultats négatifs obtenus dans la recherche d'un système enzymatique réduisant les nitrates chez les végétaux supérieurs.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEMOIGNE (M.), GRELET (N.), CROSON (M.) et LE TREIS (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1945, **27**, 90.
- [2] LEMOIGNE (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1911, **152**, 1873.
- [3] LEMOIGNE (M.) et GAVARD (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 419.
- [4] LEMOIGNE (M.), DESVEAUX (R.) et GAVARD (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **218**, 215.
- [5] BURSTROM (H.). *Annals Roy. Agric. Coll. Sweden*, 1945, vol. XIII.

SUR LE RÔLE DU SÉRUM DANS LE DÉVELOPPEMENT DE *MORAXELLA LACUNATA* ET DE *NEISSERIA GONNORRHAË*

par ANDRÉ LWOFF (*).

(Service de Physiologie microbienne de l'Institut Pasteur.)

INTRODUCTION.

On sait que *Moraxella lacunata* — le bacille de Morax — ne se développe ni en bouillon de viande peptoné, ni en eau peptonée. Ainsi que l'a montré Morax il y a cinquante ans [12], sa croissance ne se produit que si l'on ajoute aux milieux usuels du sang, du liquide d'ascite ou du sérum. Une espèce très voisine de *M. lacunata*, *M. duplex liquefaciens* a cependant été décrite par Petit, qui se multiplie en bouillon peptoné simple. Nous renvoyons pour de plus amples détails sur les deux formes aux études d'ensemble du genre *Moraxella* [1, 10].

Les recherches de R. Cailleau [2] ont montré que le sérum indispensable au développement *in vitro* des Trichomonadines agit en tant que source de cholestérol, dont la spécificité a été bien démontrée par l'étude de nombreux dérivés. Ch. W. Rees, J. Bozicevich, L. V. Reardon et F. S. Daft [13] ont mis en évidence le rôle du cholestérol dans le développement d'*Entamoeba dysenteriae*.

On était donc en droit de se demander si le sérum qu'il est nécessaire d'ajouter aux milieux usuels pour obtenir le développement de certaines bactéries parasites n'agissait pas comme source de cholestérol dont le rôle aurait été celui d'un facteur de croissance, c'est-à-dire d'un métabolite essentiel dont l'organisme est incapable de réaliser la synthèse. C'est le problème que nous avons tenté de résoudre.

Moraxella lacunata. — Nous avons, il y a plusieurs années, avec Michel Backès, abordé le problème de la nature du facteur de croissance apporté par le sérum et étions arrivés, par l'étude comparative du sérum délipidé et du même sérum enrichi en cholestérol, à la conclusion que le cholestérol était la substance du sérum active pour *Moraxella lacunata*. Cette conclusion fut communiquée à P. Fildes qui en fit mention dans sa communication au Congrès de Microbiologie en 1939 [4]. Les recherches furent interrompues par les circonstances et nous n'avons pas publié nos résultats en raison de certaines irrégularités dont nous

(*) Société Française de Microbiologie, 6 février 1947.

n'arrivions pas à saisir la cause. De plus, nous nous trouvions aux prises avec des difficultés théoriques. Nous imaginions en effet que le cholestérol devait être fourni aux bactéries sous une forme soluble dans l'eau. W. H. Rees nous ayant très aimablement fait don de sulfate de cholestérol sodique préparé selon Sobel et ses collaborateurs [14] et qui est soluble dans l'eau, nous avons repris nos essais.

Les expériences donnaient des résultats conformes aux prévisions. Les résultats obtenus sur la souche de *M. lacunata* 260 de la collection de l'Institut Pasteur, que nous devons à l'obligeance de notre collègue R. Legroux, peuvent se résumer ainsi :

1° Bouillon : 0

2° Bouillon + sérum (1 p. 100) : +

3° Bouillon + sulfate de cholestérol sodique (1×10^{-5}) : +
(0 = pas de culture, + = culture abondante.)

Le problème du mode d'action du sérum semblait donc résolu. Le sérum apportait au bacille de Morax un facteur de croissance qui n'était autre que le cholestérol.

Cependant, certains tubes de bouillon non additionnés de sérum et de cholestérol montraient parfois — très irrégulièrement — un développement et l'action de sérum n'était pas quantitative. De très nombreuses séries d'expériences nous amenèrent enfin à la constatation suivante : un bouillon peptoné impropre au développement sans addition de sérum ou de cholestérol permet la culture s'il est additionné d'un volume égal d'eau distillée ou d'une solution de chlorure de sodium à 0,6 p. 100.

Des résultats comparables étaient obtenus avec d'autres milieux, L'eau peptonée (peptone « 5 C » de Vaillant) à 2 p. 100 ne permet la culture du bacille de Morax qu'après addition de sérum ou de cholestérol. L'eau peptonée à 1 p. 100 permet parfois la culture, de façon assez irrégulière d'ailleurs, sans addition de sérum ou de cholestérol.

Il convient de se souvenir que les diverses peptones commerciales diffèrent considérablement. C'est ainsi que la protéose-peptone Difco à 1 ou 2 p. 100 a permis le développement de la bactérie dans une série d'expériences. Dans une autre série, seuls les tubes additionnés de sérum ont montré une culture, à l'exclusion des témoins et des tubes additionnés de cholestérol. Il reste possible que quelque facteur bactérien intrinsèque variable soit responsable de l'irrégularité des résultats. Nous n'avons pas cherché à le définir.

Nous ajouterons que la peptone épuisée par l'éther (quarante-huit heures dans un appareil Soxhlet) s'est montrée nettement moins toxique que la même peptone non traitée. La toxicité du bouillon de viande peptoné n'est d'ailleurs pas due seulement à la peptone qui entre dans sa constitution. La macération de

viande non peptonée et non diluée ne permet pas en effet la culture du bacille de Morax sans addition de sérum ou de cholestérol.

De toute façon, on retiendra de ces expériences que des souches de *Moraxella lacunata* incapables de se développer en bouillon peptoné peuvent fort bien se multiplier dans ce milieu additionné de sérum, de cholestérol ou simplement dilué avec de l'eau salée ou non. Nous avons [10] proposé comme caractère différentiel de *M. lacunata* et de *M. duplex*, la nécessité du sérum comme source de facteur de croissance pour la première de ces formes. L'étude comparative des deux « espèces » est donc à reprendre sur des bases nouvelles. La nécessité de l'addition à certains milieux de sérum ou de cholestérol ne semble en effet pas traduire une différence dans le pouvoir de synthèse, mais bien plutôt, on le verra dans la discussion de ce travail, une inégale sensibilité à certaines substances inhibitrices.

Neisseria gonorrhæa. — Ces constatations relatives aux *Moraxella* posaient tout naturellement le problème de la culture du gonocoque. On sait que les diverses souches de cette bactérie se développent plus ou moins facilement dans les milieux ordinaires. Nous avons examiné 10 souches de la collection du service des vaccins de l'Institut Pasteur que nous devons à l'obligeance de notre collègue Bonnefoi. Huit d'entre elles se sont développées d'emblée en bouillon peptoné, alors que deux autres, les souches B. et L. se développaient seulement dans le même bouillon peptoné additionné de sérum à 1 p. 100 ou de sulfate de cholestérol sodique à 1 p. 100.000. Le développement avait lieu également dans le bouillon peptoné dilué avec de l'eau salée à 6 p. 1.000.

Mais il convient d'attirer l'attention sur un point important. Les résultats dépendent essentiellement de l'abondance de l'ensemencement. C'est ainsi qu'un tube renfermant 5 cm³ de macération de viande peptonée ne montrera pas de culture, même après six jours, s'il est ensemencé avec une goutte de souche. Il y aura un développement abondant en vingt-quatre heures s'il a été additionné de cholestérol. Par contre le développement sera normal sans cholestérol après ensemencement de IV gouttes de souche.

	SOUCHE	
	I goutte	IV gouttes
Bouillon peptoné	0	+
Bouillon peptoné + cholestérol	+	+

Si la ou les substances inhibitrices sont réparties entre les bactéries, leur effet doit être d'autant moins marqué que l'ensemencement aura été plus abondant. De toute façon, il ressort de ces essais qu'une différence dans l'importance de l'ensemencement peut donner des résultats en apparence qualitativement différents

se traduisant par la nécessité ou la non nécessité de l'adjonction de sérum.

Il y a d'ailleurs fort longtemps que l'action « toxique » de certains milieux peptonés est connue pour le gonocoque [41] et Wright [45, 46] a considéré l'effet inhibiteur de la peptone sur les organismes à croissance « délicate » comme l'effet de l'action d'une substance oxydée, produite durant le chauffage du milieu. Cette substance, pas plus que celle ou celles dont l'activité est supprimée par le cholestérol, n'a encore été identifiée.

DISCUSSION

Nous avons, au début de nos essais, considéré le sérum comme une source de facteur de croissance qui aurait été le cholestérol. Mais il restait à comprendre comment l'adjonction d'eau pouvait jouer le même rôle que l'addition de cholestérol. Kodicek [6, 7, 8,] a montré que certains acides non saturés comme les acides linoléique et linolénique exercent une action inhibitrice sur *Lactobacillus helveticus* et que cette action est supprimée par le cholestérol (1×10^{-5}) et le chlorure de calcium. D'un autre côté, Dubos et Davis [3] ont établi que les Mycobactéries de la tuberculose sont inhibées par les acides gras à chaîne longue, à concentration très faible, et que cet effet toxique est neutralisé par la sérumalbumine. La sérumalbumine, concluent Dubos et Davis, n'agit pas en tant que source de substances accélérant la croissance, mais plutôt en raison de son aptitude à protéger les organismes contre un milieu « inamical ».

A la lumière des données apportées par Kodicek et par Dubos et Davis, nos résultats deviennent faciles à interpréter. Le bouillon peptoné ou l'eau peptonée renferment des substances inhibitrices. Le sérum et le cholestérol neutralisent ces substances. La dilution du milieu amène la concentration de ces substances inhibitrices à un niveau compatible avec la croissance.

Il convient de rappeler ici, à titre historique, que Zipfel, a proposé en 1912 un milieu au cholestérol pour la culture des bactéries des nodosités des légumineuses. Cependant, pour Zipfel, le cholestérol est dépourvu d'action sur la croissance des bactéries. On rappellera aussi que Lominski a donné la formule d'un bouillon peptoné qui comprend de la lécithine et du cholestérol. Ce milieu, d'après Lominski, donne des résultats très supérieurs au bouillon ordinaire pour la culture des bacilles tuberculeux de type humain et bovin. On ne trouve dans le travail de Lominski la relation d'aucune expérience démontrant l'activité propre du cholestérol.

De toutes façons, la sensibilité des diverses bactéries aux substances inhibitrices du bouillon et de la peptone est très variable. Seules, certaines bactéries pathogènes sont officiellement tenues

comme ayant « besoin » de sérum pour se développer en bouillon peptoné. Toutefois, il pourrait bien n'exister entre les formes « normales » et les formes « sensibles » que des différences quantitatives.

En dehors des cas où le sérum agit comme source d'un stérol spécifique ou d'un autre facteur de croissance, la nécessité ou la non nécessité de l'adjonction aux milieux de cultures usuels semble donc être l'expression d'une inégale sensibilité des diverses espèces microbiennes à des substances inhibitrices.

RÉSUMÉ.

1° Certains bouillons de viande peptonés ou l'eau peptonée à 2 p. 100 ne permettent pas la culture de *Moraxella lacunata*.

2° L'addition à ces milieux de sérum, de cholestérol ou la simple dilution avec de l'eau permettent le développement.

3° Certaines souches de *Neisseria gonorrhæ* ne se développent pas en bouillon peptoné après ensemencement faible. Elles s'y développent après ensemencement abondant. Elles se multiplient également, après ensemencement faible, si le milieu a été additionné de sérum, de cholestérol ou s'il a été dilué avec de l'eau.

4° Le sérum ne constitue pas, dans les cas considérés, une source de facteur de croissance. Le cholestérol n'est pas un « facteur de croissance » au sens strict.

5° Le cholestérol agit en neutralisant certaines substances inhibitrices. La dilution du milieu diminue leur concentration.

6° Le besoin de sérum manifesté par certains microorganismes est, dans les cas étudiés, la manifestation d'une sensibilité particulière à des substances inhibitrices.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUDUREAU (A.). *Ces Annales*, 1940, **64**, 126.
- [2] CAILLEAU (R.). *Ces Annales*, 1937, **59**, 137-176, 293-330.
- [3] DUBOS (R. J.) et DAVIS (B. D.). *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 409-423.
- [4] FILDES (P.). *Third International Congress for Microbiology*, New-York, 1939, *Report of Proceedings*, 63-72.
- [5] GORDON (J.) et McLEOD (J. W.). *J. Path. a. Bact.*, 1926, **29**, 13-25.
- [6] KODICEK (E.) et WORDEN (A. N.). *Biochem. J.*, 1945, **39**, 78-85.
- [7] KODICEK (E.) et WORDEN (A. N.). *Nature*, 1944, **154**, 17.
- [8] KODICEK (E.) et WORDEN (A. N.). *Nature*, 1946, **157**, 587.
- [9] LOMINSKI (I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **105**, 601-604.
- [10] LWOFF (A.). *Ces Annales*, 1939, **62**, 168.
- [11] McLEOD (J. W.), WHEATLEY (B.) et PHELON (H. V.). *Brit. J. exp. Path.*, 1927, **8**, 25-37.
- [12] MORAX (V.). *Ces Annales*, 1896, **10**, 337.

- [13] REES (W. H.), BOZICEVICH (J.), REARDON (L. V.) et DAFT (F. S.).
Amer. J. trop. Med., 1944, **24**, 189-193.
- [14] SOBEL (A. E.) et SPOERRI (P. E.). *J. Amer. Chem. Soc.*, 1941, **63**,
1.259.
- [15] WRIGHT (H. D.). *J. Path. a. Bact.*, 1929, **32**, 203.
- [16] WRIGHT (H. D.). *J. Path. a. Bact.*, 1929, **37**, 257.
- [17] ZIPPEL (H.). *Zentralbl. Bakt. I.*, 2^e 1912, **32**, 97-137.

ACTION DU PH SUR LES BACTÉRIOPHAGES C₁₆ ET S₁₃

par R. WAHL et L. BLUM-ÉMERIQUE (*).

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

On sait que les bactériophages sont inactivés à certains pH.

Mais si on cherche à se faire une idée précise des conditions de cette inactivation, on remarque que les résultats obtenus par les différents auteurs ne peuvent pas être comparés entre eux et que parfois ils semblent se contredire. C'est que l'inactivation qu'ils ont constatée résulte non seulement du pH, mais parfois d'autres causes associées, dépendant des conditions expérimentales particulières à chacun.

Parmi ces causes associées, il faut compter la composition du milieu (en ions notamment), la température, la lumière et surtout l'oxydation. Nous avons montré le rôle de ces deux dernières causes d'inactivation dans des publications antérieures (1).

Nous avons donc pensé qu'il était utile de reprendre cette étude en éliminant les causes d'erreur dues à ces divers facteurs.

TECHNIQUE.

On prépare dans des fioles d'Erlenmeyer des solutions tampons (100 cm³ environ par fiole), à différents pH.

On a utilisé pour les pH compris entre 7,7 et 6,0 les mélanges de phosphates de Sørensen et pour les pH compris entre 6,0 et 3,0 les mélanges d'acétate et d'acide acétique de Walpole. Ces solutions sont stérilisées. Dans toutes, la concentration moléculaire en anions PO⁴+++ ou CH³COO⁺ est la même (M/15).

Dans chaque fiole, on introduit quelques gouttes d'une dilution de phage dans de l'eau bidistillée, de façon que 1 goutte du mélange final, étalée sur une plaque de gélose nutritive avec le germe sensible, donne au début de l'expérience quelques centaines de plages. La dilution du phage dans le tampon est faite avec soin, mais en évitant le brassage avec l'air.

Après avoir titré, au départ, chacune des suspensions de phages tamponnées, on la distribue dans des tubes de Hall avec une pipette introduite au fond du tube, et en évitant d'emprisonner

(1) R. WAHL, ces *Annales*, 1946, 72, 284. — R. WAHL et L. BLUM-ÉMERIQUE, ces *Annales*, 1946, 72, 959.

(*) Société Française de Microbiologie, 5 décembre 1946.

des bulles d'air au-dessous de la bille de verre qui surmonte l'étranglement. Le niveau du liquide dépasse cette bille de 1 cm. environ. Les tubes sont maintenus à l'étuve à 20° pendant toute l'expérience. Chaque tube n'est utilisé que pour un seul titrage. Pour faire ce titrage, on rejette d'abord, sans secouer le tube, le liquide qui surmonte l'étranglement ; on vide ensuite dans un tube à essai, rapidement, par quelques secousses, tout le liquide resté emprisonné au-dessus de l'étranglement.

Les titrages sont faits par la méthode des plages, en prenant la moyenne de trois numérations. La même pipette est utilisée pour tous les titrages d'une série. Toutes les manipulations sont faites stérilement et pour S_{13} très sensible à la lumière, dans une chambre noire sous un éclairage rouge peu intense.

En résumé, la composition du milieu est définie, la température est constante, l'action des rayons visibles est éliminée et celle de l'oxydation est réduite et du même ordre de grandeur pour toutes les expériences.

RÉSULTAT DES EXPÉRIENCES ET DISCUSSION.

Nous avons choisi deux phages C_{16} et S_{13} , très différents par leur taille, et leur sensibilité aux diverses causes d'inactivation.

Dans l'ensemble, ils se comportent de la même façon vis-à-vis des variations de pH.

Quelques essais préalables, ayant permis de se rendre compte de la vitesse d'inactivation à différents pH, nous avons fait ensuite de nombreuses expériences à des pH variés entre 7,8 et 3. Dans chacune de celles-ci on faisait des titrages à intervalles convenablement choisis et on traçait les courbes d'inactivation. Les phages étudiés étaient inactivés, dans les conditions de nos expériences, en un temps variable qui dépend du pH. L'inactivation totale durait au maximum une dizaine de jours (pour les pH les plus élevés) ; elle était presque instantanée pour les pH les plus bas.

Mais la relation entre le temps d'inactivation et le pH n'est pas la même dans toute l'échelle.

Au contraire, il existe à ce point de vue deux zones de pH différentes : dans l'une, l'inactivation est lente et sa vitesse varie peu avec le pH ; dans l'autre, elle est rapide et sa vitesse croît rapidement pour des pH décroissants.

ZONE D'INACTIVATION LENTE.

La limite inférieure de cette zone est peu différente pour C_{16} et pour S_{13} . Dans les deux cas, elle est proche de pH 4,0.

Les tableaux I et II indiquent un certain nombre de résultats pour les deux bactériophages.

TABLEAU I. — Zone d'inactivation lente. Phage C₁₆.

pH	NOMBRE DE PHAGES RESTANT POUR 100 APRÈS						
	6 heures	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours	7 jours
7,79 . . .	105	134	120	100	60	84	39
7,59 . . .					139		
7,27 . . .					65	77	
7,16 . . .					123		
6,75 . . .		100	97	119	123		32
6,49 . . .		117	105	107	112		30
5,97 . . .			113			112	31
5,0 . . .	130	143	127		126		24
4,8 . . .	100		122	105		45	
4,3 . . .	95	130	130	68			
		69	37	17			

TABLEAU II. — Zone d'inactivation lente. Phage S₁₃.

pH	NOMBRE DE PHAGES RESTANT POUR 100 APRÈS					
	24 heures	48 heures	96 heures	120 heures	170 heures	194 heures
7,60 . . .	150	132	110	110	60	75
7,1 . . .		140	110	110	100	
6,79 . . .		80	81	38	53	
6,41 . . .		62	56	45	43	
5,9 . . .	108	80	64	20	6	3
4,75 . . .						
4,75 . . .	62		16	7		

Il suffit de les discuter pour C₁₆, le phénomène étant le même pour les deux bactériophages.

On voit que dans une zone très étendue (de pH 7,8 à pH 4,8) la marche de l'inactivation est la même. Toutes les courbes d'inactivation sont semblables entre elles et il suffit d'en tracer une pour les connaître toutes.

Soit N₀ le nombre de phages actifs au départ (nombre de phages donnés par 1 goutte de suspension). N ce nombre à l'instant *t*, les ordonnées indiquent les valeurs de l'expérience $\frac{N}{N_0} \times 100$.

Prenons par exemple la courbe à pH 5,0 (fig. 1).

Le nombre de phages augmente d'abord jusqu'à un maximum, puis s'abaisse pour revenir à sa valeur initiale, quelques jours après le début de l'expérience. La courbe comprend donc trois parties :

La première est ascendante, la deuxième (à peu près symé-

trique de la première) descend pour revenir à peu près à l'ordonnée du début. La troisième partie de la courbe est également descendante, mais sa pente est généralement différente de celle de la seconde.

Le temps d'inactivation totale est de même ordre de grandeur dans toute cette zone de pH. L'explication de l'augmentation initiale (apparente ou réelle) du nombre des phages actifs reste à trouver, mais nous avons montré que l'inactivation progressive qui s'exprime dans la troisième partie des courbes est due à l'oxydation.

En réalité, on observe des différences entre les pentes des troisièmes parties des courbes. Bien que minimes, ces différences

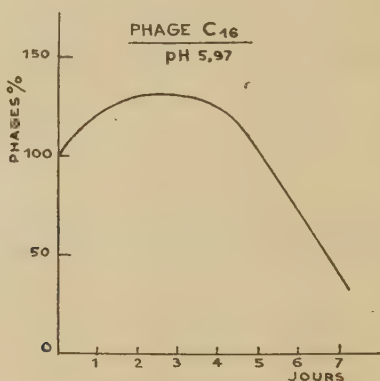


FIG. 1.

ne doivent pas être considérées comme négligeables, car elles sont toujours dans le même sens, c'est-à-dire que la pente augmente légèrement quand le pH baisse ; probablement parce que cette baisse du pH favorise l'oxydation.

Entre pH 4,5 et pH 4,0 environ, l'inactivation, bien que durant encore plusieurs jours, est plus rapide. Les courbes sont alors semblables à celles que nous avons considérées dans le mémoire déjà cité comme correspondant à une oxydation plus intense : le titre diminue d'emblée, la phase initiale d'augmentation manque. On ne peut décider si les ions H^+ agissent uniquement encore sur le potentiel d'oxydo-réduction ou si leur action directe sur le phage se fait déjà sentir.

ZONE D'INACTIVATION RAPIDE.

Examinons le cas du phage C_{16} (fig. 2) : à pH 3,69, l'inactivation totale ne demande que cinq heures et demie ; à pH 3,60,

une heure ; à pH 3,3, elle est presque instantanée : à peine le phage est-il dilué dans la solution tampon que son titre a déjà baissé de 30 p. 100. On voit que, alors que dans la zone d'inactivation lente, la vitesse d'inactivation est presque indépendante du pH, elle augmente ici très vite avec la concentration en ions H^+ .

Pour le phage S_{13} , les choses se passent de façon analogue, mais l'inactivation est un peu plus lente pour un même pH : à pH 3,69, l'inactivation totale met quinze heures ; à pH 3,39, elle met quatre heures à se produire.

Pour nous résumer, nous avons constaté dans les conditions de

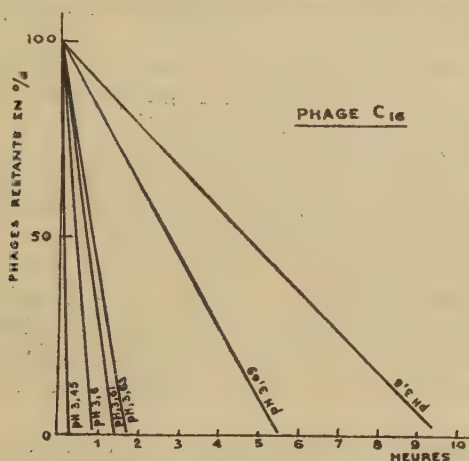


FIG. 2.

nos expériences que les phages C_{16} et S_{13} ne sont très sensibles à l'acidité qu'au-dessous d'un pH assez bas, environ 4,0 pour C_{16} comme pour S_{13} . Au-dessus de ce pH critique les phages sont presque indifférents à la concentration en ions H^+ , sauf peut-être pour les pH les plus bas de cette zone où une petite action du pH est possible.

Cependant il importe de faire quelques remarques supplémentaires au sujet de l'inactivation lente des phages par oxydation. Sa vitesse dépend du milieu (présence de certains ions, de tampons d'oxydo-réduction) et du contact avec l'oxygène de l'air. La vitesse d'inactivation est indépendante de la concentration du phage, mais naturellement le temps d'inactivation totale est d'autant plus long, toutes choses égales d'ailleurs, qu'il y a plus de phages à inactiver.

Ces considérations permettent de comprendre certains résultats parfois en apparence paradoxaux de travaux antérieurs.

En général, ces travaux se proposent de déterminer le temps d'inactivation totale d'un lysat en bouillon. Dans la zone des pH où l'inactivation est lente, ce temps est beaucoup plus long que pour les dilutions que nous avons utilisées, car le titre en est environ 10^5 fois plus élevé. De plus, les expériences sont faites sans précautions contre l'oxydation, à des températures variables et les résultats sont très variables.

C'est ainsi que pour d'Hérelle (2), en milieu tant soit peu acide, un phage ne se conserve que quelques semaines, au lieu de quelques mois en milieu neutre.

Au contraire Vaccaro et Perez (3) constatent qu'il faut dix mois pour inactiver certains phages à pH 4,0 et quatorze mois à pH 5,2, à 5,8.

Les expériences anciennes de da Costa Cruz (4) relèvent certainement d'une autre interprétation. Il n'a plus retrouvé d'activité dans une dilution de phage après un séjour d'une demi-heure à pH 6,09 suivi de filtration sur bougie, mais on sait actuellement que les phages sont adsorbés par les bougies à certains pH et dans certains milieux. D'ailleurs cet auteur retrouve en partie l'activité du phage quand il ramène le pH à 7,8 avec de la soude diluée avant de filtrer.

Dans la zone d'inactivation rapide, au contraire, le temps d'inactivation totale de lysats même concentrés est très court ; il diffère peu en moyenne de celui des suspensions de phages dilués.

Les travaux publiés montrent bien que ce temps varie suivant les phages :

Ainsi Wollman et Wollman (5) constatent qu'un phage du staphylocoque est détruit en vingt-quatre heures à pH 4,65, alors que certains phages résistent pendant dix mois à pH 4,0.

Bronfenbrenner et Korb (6) constatent qu'à 7°, pendant trois heures, un phage du staphylocoque est inactivé totalement au-dessous de pH 4,2. Un phage de *B. de Shiga* au-dessous de 3,75, un phage de *B. pestis cavix* au-dessous de pH 3,0.

Pour Siérakowski et Zabłudowska (7), l'inactivation totale se fait entre pH 4,3 et pH 3,3 suivant les phages.

La majorité des phages étudiés par Gratia (8) sont inactivés totalement à pH 3,8 en quinze minutes et tous sauf un le sont à pH 3,0 en trois heures.

(2) d'HÉRELLE, *Le bactériophage et son comportement*. Paris, 1928.

(3) H. VACCARO et M. PÉREZ, *Rev. Inst. Bact. Chile*, 1936, 5, 35.

(4) J. DA COSTA CRUZ, *Braz. med.*, 1924, 38, n° 1, 50.

(5) E. WÖLLMAN et F. WÖLLMAN, *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 99, 1703.

(6) J. BRONFENBRENNER et C. KORB, *J. exp. Med.*, 1925, 42, 1821.

(7) S. SIÉRAKOWSKI et F. ZABŁUDOWSKA, *C. R. Soc. Biol.*, 1930, 103, 422.

(8) A. GRATIA, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 349.

Les pH d'inactivation totale d'un lysat en un temps donné diffèrent donc suivant les phages (de pH 4 et pH 3,0).

Ces résultats n'ont qu'une valeur relative et ne permettent des comparaisons que dans une même série d'expériences, car les expériences ne sont pas faites dans un milieu défini, et Gratia remarque lui-même que certains ions (citrate) modifient le pH d'inactivation totale. Cependant, ils permettent de constater que la sensibilité à l'acidité n'est pas la même pour tous les phages.

REVERSIBILITÉ DE L'INACTIVATION PAR L'ACIDITÉ. — L'action de l'acidité ne se manifeste donc réellement qu'au-dessous d'un certain pH (4,0 pour C_{16}). Peut-on, en neutralisant avant l'inactivation totale, empêcher sa continuation et même réactiver une partie des phages? Pour répondre à cette question, nous avons fait les expériences suivantes :

Expériences.

Les essais ont été faits comme suit :

On fait une suspension de phage C_{16} dans 50 cm³ d'une solution tampon de pH 3,6 à 3,7 et on titre aussitôt (I goutte de cette suspension diluée au 1/10 doit donner environ 700 à 800 plages). Après un temps de séjour à la glacière, variant d'une demi-heure à une heure et demie, on titre à nouveau, et on verse 1 cm³ de cette suspension acide dans 9 cm³ d'une solution tampon à pH 7. On étale I goutte de cette suspension neutralisée avec le germe sensible après des temps variables.

Dans toutes les expériences sans exception, on a constaté que le titre de la dilution de phage neutralisé non seulement ne baissait plus, mais remontait, la réactivation était progressive comme l'avait été l'inactivation (tableau).

Dans nos premiers essais nous neutralisons le milieu acide

TABLEAU.

pH	APRÈS ACIDIFICATION Phages actifs p. 100	APRÈS NEUTRALISATION	
		Temps / coulé après neutralisation (minutes)	Phages actifs p. 100
3,64	40	15	58
3,63	44	20	80
		15	29
3,61	26	30	33
		75	37
		115	38
3,69	88	75	93
3,70	71	140	100
		45	80

avec une solution diluée de potasse. Les résultats étaient tout autres : immédiatement le titre baissait d'environ 50 p. 100, puis il se maintenait au même chiffre pendant plusieurs heures. Il semble qu'avant que la potasse soit bien mélangée une certaine quantité de phages soit inactivée par contact avec une solution relativement concentrée de potasse.

La même explication est peut-être valable pour les résultats curieux de Moriyama et Ohashi (9) qui inactivent une préparation de phages préalablement acidifiée en la neutralisant avec de la soude au 1/10. Ce phénomène ne se produirait, d'après ces auteurs, que pour certaines compositions salines du milieu, différentes suivant les phages.

CONCLUSIONS.

1° L'action du pH sur les phages C_{15} et S_{13} ne se manifeste réellement du côté de la zone acide qu'au-dessous d'un pH critique très bas, qui est de 4,0 et qui est probablement différent pour d'autres phages. L'inactivation est alors très rapide et sa vitesse augmente très vite avec la concentration des ions H^+ .

2° Cette inactivation est dans une certaine mesure reversible.

3° Au-dessus de ce pH critique, l'inactivation que l'on a parfois attribuée à l'acidité paraît due à d'autres causes, dont la plus importante est l'oxydation.

(9) H. MORIYAMA et S. OHASHI, *Arch. ges. Virusf.*, 1939, **1**, 267.

RECHERCHES SUR LA SPÉCIFICITÉ DES PROTÉIDES DES BACILLES TUBERCULEUX ET DES SÉRUMS ANTI- BACILLES BOVINS LISSES AU MOYEN D'UNE TECHNI- QUE QUANTITATIVE DE LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT. MISE EN EVIDENCE D'UN ANTIGÈNE SPECIFIQUE DU TYPE DANS LES PROTÉIDES DES BACILLES DU TYPE BOVIN ET D'UN COMPLEXE GLUCI- DOPROTEIDIQUE DANS LES PROTÉIDES DES BACILLES DU TYPE HUMAIN

par W. SCHAEFER. (*)

(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)

Les recherches de Dean [1] et de Goldsworthy [2] sur les relations entre la réaction de précipitation et la réaction de fixation du complément, ont montré que si on effectue la réaction de fixation avec des sérums dont le pouvoir précipitant n'est pas trop intense en mélangeant une quantité fixe d'antisérum avec des quantités variables d'antigène, la plus grande quantité de complément est fixée lorsque l'anticorps et l'antigène sont mélangés en proportions équivalentes. La détermination du point *optimum* de fixation permet donc de déterminer les quantités d'antigène et d'anticorps qui se neutralisent mutuellement et ainsi de connaître l'activité respective de ces deux éléments.

Nous avons utilisé ce principe pour une méthode d'analyse quantitative des divers facteurs antigéniques contenus dans les protéides des bacilles tuberculeux et des anticorps correspondants des sérums préparés par des bacilles tuberculeux du type bovin lisse [3].

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES ET DES ANTISÉRUMS.

Les protéides des bacilles tuberculeux bovins ont été isolés du milieu liquide synthétique de cultures de souches bovines rugueuses âgées de six à dix semaines. Le liquide a été filtré sur filtre bactériologique de Seitz et précipité ensuite par le sulfate d'ammonium à saturation. Le précipité a été redissous, dialysé à la glacière pendant trois à

(*) Société Française de Microbiologie, 6 mars 1947.

quatre jours et desséché dans le vide en présence d'anhydride phosphorique. La préparation ainsi obtenue contient environ 70 p. 100 de protéides précipitables par l'acide trichloracétique.

Les protéides des bacilles humains ont été obtenus par le même procédé. Ils contiennent environ 50 à 60 p. 100 de protéides. A titre de comparaison nous avons étudié aussi une préparation de protéides du type humain préparée par Fl.-B. Seibert [4] connue sous le nom PPD (purified protein derivative) et qui est employée aux Etats-Unis comme tuberculine étalon. Cette préparation (PPD 12-10) est obtenue par précipitation de filtrat de cultures par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Elle contient encore un faible pourcentage de glucides (5,9 p. 100), mais ses solutions sont calculées pour une teneur en protéides de 100 p. 100 (1).

Les résultats de l'examen sérologique de cette préparation, représentés dans les fig. 1, 2 et 3, sont tout à fait analogues à ceux obtenus avec nos propres préparations de protéides du type humain.

Les *antisérums* ont été préparés par trois injections sous-cutanées de 100, 50 et 50 mg. de bacilles tuberculeux bovins lisses cultivés sur un milieu à base d'œuf et de sérum coagulé ou sur tranches de foie. Les bacilles ont été tués par chauffage d'une heure à 90° C. et pesés à l'état sec. Les animaux ont été saignés sept jours après la dernière injection.

MÉTHODE SÉROLOGIQUE.

Pour le *titrage sérologique* nous avons préparé plusieurs séries identiques de doses décroissantes de protéides. Ces dilutions ont été faites en partant d'une part d'une solution de protéide à 1 p. 1.000 et, d'autre part, de la même solution préalablement soumise à une digestion par la trypsine. Ceci a été fait pour vérifier si le pouvoir fixateur de nos préparations est dû aux protéides qu'elles contiennent ou à des impuretés d'une autre nature.

Technique de la digestion. — On alcalinise quelques centimètres cubes prélevés sur la solution de l'antigène à 1 p. 1.000 par II gouttes de soude N/10, on ajoute quelques milligrammes de trypsine et I goutte de toluène et on laisse à l'étuve pendant une nuit. Le lendemain on vérifie sur une petite quantité de ce mélange qu'il n'est plus précipité par l'acide trichloracétique et, au cas où la digestion ne serait pas complète, on ajoute de nouveau un peu de trypsine en réajustant éventuellement le pH. La solution digérée est ensuite examinée sérologiquement en même temps que la solution non digérée.

On ajoute à chaque série de dilutions de l'antigène une quantité

(1) Nous devons cette préparation (PPD 12-10) à l'obligeance de M. A. Boquet qui la tenait du Dr Seibert.

fixe, mais décroissante d'une série à l'autre, de l'antisérum (1/5, 1/10, 1/20, etc.) et à tous les tubes une quantité constante de complément (2 unités). Le volume de chacun des divers éléments de la réaction est 0,15 cm³. On laisse les mélanges pendant deux heures ou, mieux, pendant quinze à vingt heures à la glacière à 4-6° et on ajoute à tous les tubes le système hémolytique composé de 2 unités de sérum hémolytique et d'une suspension de globules rouges à 5 p. 100. On porte les tubes à l'étuve et on note les résultats de l'hémolyse, après la lyse des témoins, à des temps déterminés.

On peut donner une représentation graphique des résultats en inscrivant les doses maxima et minima fixatrices, obtenues dans les diverses séries, dans un diagramme dont l'abscisse représente les doses décroissantes d'antigène et l'ordonnée les doses décroissantes de l'antisérum.

Résultats expérimentaux.

Les titrages effectués selon cette méthode montrent que le sérum B1 (fig. 1), réagit spécifiquement avec les protéides des bacilles bovins. En effet, ce sérum réagit avec le protéide bovin jusqu'à une solution dépassant 1 : 2.000.000 et l'optimum de la réaction correspond à la dilution de 1 : 1.000.000. Un excès d'antigène inhibe la réaction. La digestion trypsique abolit complètement le pouvoir fixateur de ce protéide. Le sérum B2 (fig. 2), par contre, ne réagit pas du tout avec ce protéide.

Le protéide du type humain, par contre, réagit avec les deux sérums jusqu'à la dilution 1 : 40.000, c'est-à-dire que son activité est 25 fois moindre que celle du protéide bovin. Cette faible activité sérologique persiste après la digestion des protéides. Il est permis de supposer qu'elle est due à la présence d'impuretés de nature glucidique.

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons comparé, en présence du sérum B2 qui réagit à des dilutions fortes avec les protéides humains, la réaction du protéide digérée et celle d'une préparation de glucides de bacilles tuberculeux humains étudiée dans un travail antérieur [5] et qui possède toutes les propriétés caractéristiques de l'haptène glucidique des bacilles tuberculeux. Cette expérience montre que le protéide digéré réagit avec des dilutions 8 fois plus étendues de l'antisérum (1/80) que l'haptène glucidique (1/10).

Nous avons ensuite épuisé le sérum par l'haptène glucidique en précipitant les anticorps correspondants par un excès d'haptène et nous avons comparé à nouveau les réactions de l'haptène glucidique et des protéides digérés (fig. 3). Cette expérience montre que les protéides digérés réagissent encore jusqu'à la dilution du

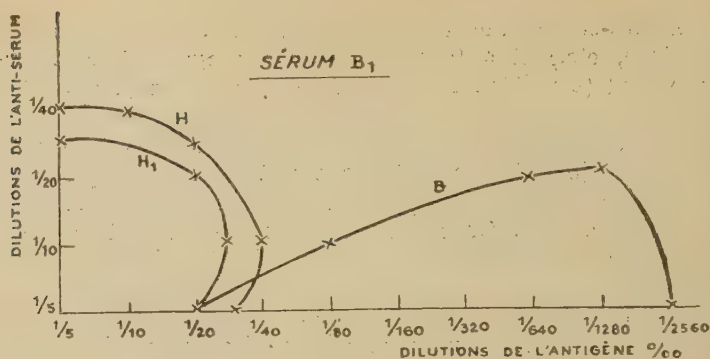


FIG. 1.

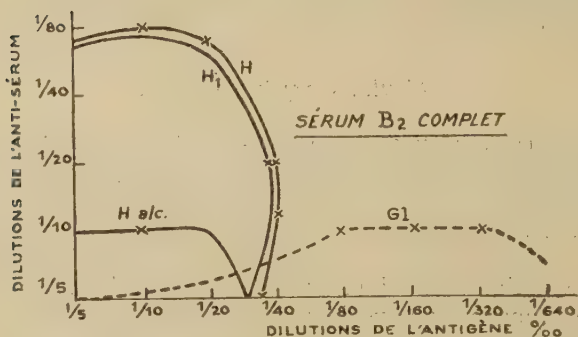


FIG. 2.

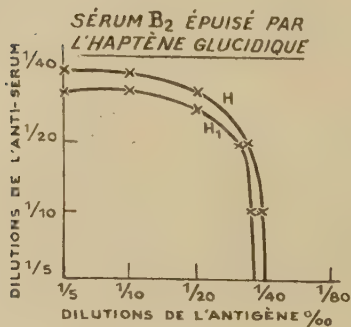


FIG. 3.

FIG. 1, 2 et 3. — H, activité sérologique de la solution non digérée des protéides du type humain; H₁, activité sérologique de la solution digérée des protéides du type humain; B, activité sérologique de la solution non digérée des protéides du type bovin; GL, activité sérologique de la solution de l'haptène glucidique; H (alc.), activité sérologique de la solution chauffée dans la soude n/5 des protéides du type humain.

sérum au 1/40, malgré l'épuisement des anticorps glucidiques. On peut en conclure que l'haptène glucidique n'intervient que pour une part relativement faible dans le pouvoir fixateur des protéides digérés.

La nature de l'antigène résistant à la trypsine des protéides du type humain s'éclaircit si on effectue l'expérience suivante : on soumet les solutions des protéides à une ébullition pendant dix minutes dans une solution de soude n/5. On neutralise et on isotonne la solution, puis on compare le pouvoir fixateur des protéides ainsi traités avec celui des protéides non traités. On constate alors que la solution des protéides chauffés dans la soude réagit avec le sérum jusqu'à la même dilution d'*antigène* que les protéides non traités, mais qu'elle ne réagit plus jusqu'à la dilution du sérum au 1/80, mais seulement jusqu'à la dilution au 1/10. Enfin la solution des protéides traités par la soude ne réagit plus du tout avec le sérum épuisé par l'haptène glucidique. Cette expérience montre donc que les protéides renferment réellement l'haptène glucidique et que cet haptène détermine le titre de leur activité, c'est-à-dire leur dose minima active, mais que les protéides digérés contiennent encore une quantité égale d'un autre antigène qui, contrairement à l'haptène glucidique, ne résiste pas au chauffage dans une solution alcaline. Le titre égal de ces deux antigènes suggère l'idée qu'ils forment un complexe et l'hypothèse la plus probable nous semble être qu'il s'agit de traces de protéides liés aux glucides et qui, grâce à cette liaison, résistent à la digestion par la trypsine.

Dans un travail antérieur consacré à l'étude de ce complexe glucidique [5], nous avons montré qu'il est présent surtout dans la fraction des protéides précipités à pH 4 en acidité acétique. Nous avons montré, en outre, qu'il est partiellement soluble dans l'alcool à 50 p. 100, mais qu'il est précipité quantitativement par l'alcool à 75 p. 100, tandis que les glucides simples qui constituent l'haptène glucidique ne sont précipités que par une concentration d'alcool à 85 p. 100. Ces propriétés du complexe glucidique et de l'haptène glucidique correspondent à celles des deux glucides de spécificité différente dont la présence dans les bacilles tuberculeux a été signalée par Heidelberger et Menzel [6].

Seibert et Watson [7] et Mc Carter et Watson [8], en employant des méthodes tout à fait différentes, sont arrivés, avant nous, aux mêmes conclusions. Ils ont montré qu'on peut isoler, des filtrats de culture des bacilles tuberculeux, par l'électrophorèse et par les méthodes chimiques, deux types de glucides. Les uns sont immobiles dans un champ électrique et solubles dans de très grandes quantités d'alcool et ils renferment 95 p. 100 de glucides et seulement 0,2 p. 100 d'azote. Les autres sont faiblement mobiles lorsqu'on les soumet à l'action d'un champ électrique, ils

sont précipités par des concentrations d'alcool plus faibles et contiennent seulement 75 p. 100 de glucides. Leur teneur en azote, même après de nombreux essais de purification par l'électrophorèse, ne descend pas au-dessous de 0,85 p. 100. L'analyse de la nature chimique de la substance azotée associée aux glucides montre qu'il s'agit de protéides et de faibles quantités de glucosamine et d'acide nucléique. Mc Carter et Watson ont montré que ces protéides liés aux glucides résistent fortement à la digestion par la trypsine et que ce sont ces traces de protéides adhérant aux glucides qui sont responsables des réactions cutanées que les préparations glucidiques déclenchent chez les sujets tuberculeux. Les recherches de ces auteurs et les nôtres conduisent donc à des résultats concordants.

La très faible activité sérologique des protéides des bacilles humains constatée dans nos expériences ne signifie naturellement pas que ces protéides sont dépourvus de propriétés antigéniques. Elle indique seulement que la structure de ces protéides diffère de celle à laquelle les anticorps antiprotéidiques des sérums étudiés sont adaptés. Nous verrons dans un travail ultérieur que d'autres sérums préparés par des bacilles bovins lisses contiennent des anticorps capables de réagir non seulement avec les protéides des bacilles de type bovin, mais encore avec ceux du type humain et même du type aviaire.

RÉSUMÉ

Certains sérums de lapins préparés par des inoculations de bacilles tuberculeux bovins lisses tués contiennent des anticorps qui réagissent spécifiquement avec les protéides des bacilles tuberculeux du type bovin et très peu avec les protéides des bacilles du type humain.

Les préparations des protéides des bacilles humains réagissent avec ces sérums principalement en raison de la présence d'impuretés glucidiques qui s'y trouvent sous forme d'un complexe glucido-protéidique.

Ces faits ont été démontrés au moyen d'une méthode quantitative de la réaction de fixation du complément.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DEAN (H. R.). *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1912, **13**, 84.
- [2] GOLDSWORTHY (N. E.). *J. Path. a. Bact.*, 1928, **31**, 220.
- [3] SCHAEFER (W.). *Ces Annales*, 1940, **64**, 517.
- [4] SEIBERT (F. B.) et GLENN (I.). *Am. Rev. Tub.*, 1941, **44**, 9.
- [5] SCHAEFER (W.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 783.
- [6] HEIDELBERGER (M.) et MENZEL (A. E. O.). *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1937, **29**, 631, et 1935, **32**, 1150 et *J. Biol. Chem.*, 1937, **118**, 79.
- [7] SEIBERT (F. B.) et WATSON (D. W.). *J. biol. Chem.*, 1941, **140**, 55.
- [8] MCCARTER (J. R.) et WATSON (D. W.). *J. Immunol.*, 1942, **43**, 85

LA BACTÉRIOPHAGIE EN MILIEUX LIQUIDES PAUVRES

par PIERRE NICOLLE et PAUL DUCREST (*)

On sait que la bactériophagie, c'est-à-dire la dissolution des bactéries sous l'action du bactériophage avec régénération concomitante de celui-ci, ne s'opère, en règle générale, qu'en présence de cultures bactériennes en croissance. Laissons de côté pour l'instant les exceptions dans lesquelles on aurait constaté une multiplication du bactériophage, avec ou sans lyse, en l'absence de division bactérienne (d'Hérelle, Mailland, Gratia et Rhodes, Krueger et Scribner, Northrop, A. Guélin, Latarjet et Rouyer, et d'autres). Dans l'immense majorité des cas, on peut admettre que c'est en milieux nutritifs que le phénomène bactériophagique s'observe.

Nous avons été amenés, pour des raisons qu'il serait sans intérêt de rapporter ici, à rechercher, en utilisant divers milieux nutritifs, jusqu'à quelles limites de dilutions le développement bactérien et la lyse peuvent encore se produire. A vrai dire, c'est une bien ancienne question que nous avons reprise, puisqu'elle a été abordée par d'Hérelle lui-même. Mais les opinions des nombreux auteurs qui s'en sont occupés après lui sont assez divergentes et nous avons pensé qu'il était utile de la reprendre systématiquement.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Nos essais ont porté sur les principaux milieux usuels : bouillons de viande par macération et par digestion, solutions de peptones diverses, autolysat de levure, hydrolysats de caséine, etc. Nous avons utilisé divers bactériophages : bactériophages staphylococciques Twort et N, dysentériques C_{16} et S_{13} .

La technique suivie est fort simple, encore qu'il ait fallu de très nombreux essais pour en fixer tous les détails. Elle exige seulement un peu de minutie. La verrerie doit être rigoureusement propre (lavage au mélange sulfochromique, rinçage prolongé à l'eau distillée, etc.). Les solutions et les dilutions sont pratiquées dans de l'eau bi-distillée. Toutes les mesures de volumes sont faites à la pipette graduée au 1/10 de centimètre cube.

Pour éviter l'introduction de substances nutritives supplémentaires provenant du filtrat bactériophagique, lors de l'addition de celui-ci, le bactériophage dont nous nous sommes servi avait été préparé en milieu déjà fortement dilué (au 1/10) et par précaution

(*) *Société Française de Microbiologie*, 5 décembre 1946.

supplémentaire, le lysat ainsi obtenu était dilué au 1/100 pour l'emploi. Dans ces conditions, le volume du phage dilué introduit dans le milieu (1/10 de centimètre cube) ne l'enrichissait pratiquement pas en substances nutritives. La suspension bactérienne pour l'ensemencement des tubes était faite en délayant dans 10 cm³ d'eau bi-distillée une anse de platine d'une culture de vingt heures sur gélose inclinée, du germe sensible. Un 1/10 de centimètre cube de cette suspension était employé pour l'ensemencement (environ vingt millions de germes).

Chaque expérience comportait deux séries de tubes : série *a*, une échelle de dilutions pour l'appréciation de l'intensité des cultures. Série *b*, la même échelle de dilutions additionnée, en plus, de bactériophage. L'ensemencement et l'addition du bactériophage se faisait en même temps. Après mélange, les tubes étaient mis à l'étuve à 37° C et surveillés d'heure en heure.

La concentration en ions hydrogène des solutions et des milieux de base était vérifiée et, le cas échéant ajustée, avant les dilutions, à pH = 7,4. D'autre part, les variations du pH des cultures lysées ou non étaient suivies et les conclusions que nous avons tirées des résultats tiennent compte de ces variations.

RÉSULTATS.

Quel que soit le milieu nutritif de base que nous avons employé, les résultats, à des différences de doses près, ont été assez analogues. Il est inutile dans cette note préliminaire de faire état de tous nos essais. Nous ne mentionnerons donc que ceux qui ont été obtenus avec le milieu nutritif le plus favorable, la solution d'une peptone commerciale (Uclaf).

Mais chaque bactériophage se comporte dans les milieux dilués d'une manière qui lui est propre et c'est précisément l'un des buts principaux de la méthode, de faire apparaître d'intéressantes différences entre les divers bactériophages (1).

Nous n'envisagerons ici que le cas du bactériophage staphylococcique Twort, nous proposant dans de prochaines publications d'examiner le comportement de quelques autres bactériophages.

1° COMPORTEMENT DU BACTÉRIOPHAGE STAPHYLOCOCCIQUE TWORT EN MILIEU DILUÉ.

Recherche de la plus faible concentration permettant encore la lyse. Deux séries de tubes sont préparées avec une échelle de concentrations en peptone de 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 3 et 30 g.

(1) d'HÉRELLE a toujours insisté avec raison sur la diversité de comportement des différents bactériophages : ce qui est valable pour l'un d'eux n'est pas valable pour tous.

TABLEAU I. — Recherche de la plus faible concentration de peptone qui permet encore la lyse bactériophagique (Peptone Uclaf.) Bactériophage staphylococcique TW.

CONCENTRATION en peptone pour 1.000 cm ³ (en g.)	SÉRIES	TEMPS D'INCUBATION A 37° C en heures									
		4	5,30	6	7	7,30	22	48	72	96	120
0,3	a b	.	.	++	++	++	++	++	++	.	.
0,6	a b	.	++	++	++	++	++	++	++	++	++
0,9	a b	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1,2	a b	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1,5	a b	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3	a b	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
30	a b	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

.. culture à peine perceptible; ++, culture nettement perceptible; +++ 50 millions de germes au centimètre cube; ++++, 100 millions de germes au centimètre cube; +++++, 200 millions de germes au centimètre cube et au-dessus; 0, lyse totale; a, série témoin sans bactériophage; b, série avec le bactériophage.

pour 1.000 cm³. Chaque tube des deux séries est ensemencé avec vingt millions de germes environ, pour 10 cm³ de milieu. La série *a* sert de témoin de culture. Tous les tubes de la série *b* reçoivent du bactériophage dilué au 1/100, de telle façon que la concentration en phage du milieu soit au départ d'environ 1.10⁵. Les deux séries sont placées à l'étuve à 37° C. Le tableau I expose les résultats :

Cette expérience, confirmée par plusieurs autres qu'il n'est pas possible de donner ici, permet les observations suivantes :

a) Aux faibles concentrations : 0,3 et 0,6 g. p. 1.000 cm³ (cent fois et cinquante fois plus diluées que l'eau peptonée habituellement employée en bactériologie), il se développe déjà des cultures perceptibles, mais aucune lyse bactériophagique ne survient. Il n'y a pas non plus de multiplication du bactériophage. Notons en passant qu'à la concentration de 0,3 g. p. 1.000, aussi bien dans les tubes témoins que dans ceux qui ont reçu le bactériophage, il se produit après quarante-huit heures une autolyse partielle. Cette autolyse manque ou elle est masquée à la concentration de 0,6 g. p. 1.000 et au-dessus.

b) A partir de la concentration de 0,9 g. p. 1.000, la lyse se produit. La méthode des échelles de dilutions de milieux permet donc de dissocier le phénomène de la lyse bactériophagique de la multiplication des bactéries. En diluant progressivement le milieu nutritif, il arrive un moment où les substances nécessaires à la culture sont encore en quantités suffisantes, alors que celles qui sont indispensables à la lyse n'ont plus la concentration voulue.

c) Les délais observés pour l'obtention de la lyse sont d'autant plus long que les dilutions du milieu sont plus étendues.

d) Alors qu'avec l'eau peptonée à 30 g. p. 1.000, la lyse est totale et généralement définitive, dans les conditions de l'expérience (le bactériophage Twort est un des rares bactériophages qui donnent la lyse définitive dans ces conditions), avec les dilutions plus étendues, on assiste à l'apparition de cultures secondaires d'autant plus rapidement que le milieu est plus dilué. Ce fait n'est pas sans intérêt, nous y reviendrons.

Notons que le pII n'a varié dans toutes ces dilutions que dans des limites très étroites : légère augmentation pour les cultures sans lyse (de 7,4 à 7,7) et légère diminution lorsque la lyse s'est produite (de 7,4 à 7,3).

2° AUGMENTATION DE LA RICHESSE DES CULTURES PAR ADDITION DE GLUCOSE.

Nous nous sommes demandé si l'absence de lyse dans les premiers tubes n'était pas due à la pauvreté du développement bactérien et si, en rendant la culture plus abondante par l'addition au milieu d'une substance sans effet par elle-même, du moins aux

doses employées, sur la lyse, nous ne verrions pas celle-ci apparaître. Nous avons essayé le glucose dans ce but. Mais l'utilisation de ce sucre est rendue difficile par le fait que les solutions glucosées stérilisées à l'autoclave ont un pH fortement acide, et que, d'autre part, les cultures de staphylocoque en présence de glucose développent une acidité gênante pour la bactériophagie. Nous avons obvié à ces inconvénients en utilisant, d'une part, une solution de glucose filtrée sur bougie et, d'autre part, en n'introduisant dans les milieux que des doses très faibles de cette solution. Ces faibles quantités de glucose permettent d'obtenir des cultures sensiblement plus denses, mais la lyse ne se produit pas davantage.

Dès que les doses deviennent plus importantes, le pH des cultures passe en quelques heures de 7,4 à 5,0, et même à 4,0. Notons que, dans les milieux usuels, à concentration normale, l'addition de glucose, même à doses relativement fortes, n'entrave pas la bactériophagie. Ces milieux étant suffisamment tamponnés, les variations du pH sont, de ce fait, réduites. D'autre part, les petites doses de glucose n'empêchent pas la lyse de se produire lorsqu'on ajoute aux milieux trop pauvres un électrolyte comme le chlorure de sodium. Le glucose, à ces concentrations, n'a donc pas par lui-même d'action empêchante.

3° ACTION DES ÉLECTROLYTES.

De tels résultats conduisent tout naturellement à se demander si l'absence de lyse dans les milieux trop dilués n'est pas due à l'extrême raréfaction en électrolytes. Da Costa Cruz (2) a été le premier à signaler que, dans les milieux très pauvres en électrolytes, la bactériophagie ne s'effectuait pas. Il suffit d'ajouter un peu d'un sel quelconque pour qu'elle apparaisse. Presqu'en même temps, Lisbonne et Carrère (3) ont confirmé le rôle des électrolytes dans la lyse bactériophagique et ont montré que c'est parce que la fixation des corpuscules bactériophages sur les bactéries ne se faisait pas en l'absence de ces substances, que la bactériophagie ne pouvait pas se produire.

Brutsaert (4) pense que certains bactériophages sont plus exigeants que d'autres en électrolytes. Ciuca (5), d'Hérelle (6) affirment, au contraire, que si le pH est alcalin, la lyse se produit dans tous les cas. On peut objecter à cette remarque que, pour rendre alcalin le milieu, il a fallu ajouter de la soude et

(2) DA COSTA CRUZ, *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, 759.

(3) LISBONNE et CARRÈRE, *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, 865.

(4) BRUTSAERT, *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 90, 1292.

(5) M. CIUCA, *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 90, 521.

(6) F. d'HÉRELLE, *Le bactériophage et son comportement*. Masson, édit., 1926.

que cette addition introduit forcément des électrolytes. Tout récemment, A. Guélin (7) a entrepris des expériences dans cette direction et a montré que les électrolytes sont bien indispensables à la fixation des corpuscules sur les bactéries. Elle a de plus prouvé que deux bactériophages actifs sur une même bactérie exigent des doses différentes d'électrolytes pour leur fixation.

A la lumière de ces faits, nous avons introduit, dans une série de tubes contenant la concentration la plus forte de peptone ne permettant pas la lyse (0,6 g. p. 1.000 de milieu), des doses croissantes d'une solution moléculaire de chlorure de sodium (tableaux II et III). On voit qu'il suffit d'ajouter au milieu trop dilué

TABLEAU II. — Action de doses croissantes de NaCl dans un milieu trop pauvre en peptone pour que la lyse se produise. 1° Faibles doses de NaCl.

CONCENTRATION en peptone pour 1.000 cm ³ (en g.)	QUANTITÉS en centimètre cube d'une solution moléculaire de NaCl pour 10 cm ³ de milieu	SÉRIES	TEMPS D'INCUBATION A 37° C en heures						
			4	5	22	48	72	96	120
0,6 . . .	0	a	.	.	+	++	+++	+++	+++
		b	.	.	+	++	+++	+++	+++
0,6 . . .	0,02	a	.	.	+	++	+++	+++	+++
		b	.	.	.	0	.	.	+
0,6 . . .	0,04	a	.	.	+	++	+++	+++	+++
		b	.	.	0	0	.	.	.
0,6 . . .	0,06	a	.	.	+	++	+++	+++	+++
		b	.	.	0	0	.	.	.
0,6 . . .	0,08	a	.	.	+	++	+++	+++	+++
		b	.	.	0	0	.	.	.
0,6 . . .	0,1	a	.	.	+	++	+++	+++	+++
		b	.	.	0	0	.	.	.
3	0		++	0	0	0	0	0	.

Série a, sans bactériophage (tubes témoins pour la culture); série b, avec bactériophage.

pour que la lyse puisse s'effectuer, des quantités extrêmement faibles de sel, et la bactériophagie se produit. Avec la plus petite dose de chlorure de sodium (0,02 cm³ de la solution moléculaire

(7) A. GUELIN, ces *Annales*, 1945, 71, 487.

TABLEAU III. — Action de doses croissantes de NaCl dans un milieu trop pauvre en peptone pour que la lyse se produise. 2° Doses moyennes de NaCl.

CONCENTRATION en peptone pour 1.000 cm ³ (en g.)	QUANTITÉS en centimètres cubes d'une solution moléculaire de NaCl pour 10 cm ³ de milieu	SÉRIES	TEMPS D'INCUBATION A 37° C en heures						
			4	5	24	48	72	96	120
0,6	0	a	.	+	++	++	+++	+++	+++
		b	.	+	++	++	+++	+++	+++
0,6	0,1	a	.	+	++	++	+++	+++	+++
		b	.	+	0	0	0	0	0
0,6	0,2	a	.	+	++	++	+++	+++	+++
		b	.	+	0	0	0	0	0
0,6	0,5	a	.	+	++	++	+++	+++	+++
		b	.	0	0	0	0	0	0
0,6	1,0	a	.	+	++	++	+++	+++	+++
		b	.	0	0	0	0	0	0

de NaCl, soit une concentration de 0,117 g. p. 1.000 cm³ de milieu), la lyse est tardive (quarante-huit heures) et elle est bientôt suivie d'une culture secondaire. A mesure que la dose de NaCl augmente, la bactériophagie devient plus rapide. Elle est aussi plus durable. Cette influence des électrolytes sur les délais d'apparition des cultures secondaires est d'un grand intérêt.

Notons en passant que l'apparition de doses moyennes de sel ne favorise pas sensiblement le développement du staphylocoque. Mais si les doses de chlorure de sodium sont trop fortes (tableau IV), les cultures sont sensiblement diminuées. Tant qu'il y a encore un développement bactérien, la lyse se produit.

Les titres bactériophagiques atteints au cours des expériences en milieu peptoné à 3 g. p. 1.000 cm³ de milieu sont à peine inférieurs à ceux qu'on obtient en eau peptonée normale (30 p. 1.000). Ces titres se maintiennent presque sans changement pendant huit à dix jours à la glacière. Ensuite, ils baissent assez rapidement (de $2,4 \cdot 10^9$ à $6,4 \cdot 10^7$ en quarante-trois jours).

• RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Lorsqu'on utilise des milieux peptonés de plus en plus dilués, l'intensité des cultures de staphylocoques décroît progressivement

TABLEAU IV. — Action de doses croissantes de NaCl dans un milieu trop pauvre en peptone pour que la lyse se produise. 3^e Doses fortes de NaCl.

CONCENTRATION en peptone pour 1.000 cm ³ (en g.)	QUANTITÉS en centimètres cubes d'une solution 5 fois moléculaire de NaCl pour 10 cm ³ de milieu	SÉRIES	TEMPS D'INCUBATION À 37° C en heures			
			5,30	7,30	24	48
0,6	1	a b	+	+	++	++ 0
0,6	5	a b
0,6	10	a b
3	0	a b	+	++	+++	+++ 0

jusqu'à devenir presque imperceptible. La lyse bactériophagique, au contraire, cesse brusquement de se produire pour une concentration en peptone (0,6 g. p. 1.000) qui permet encore un développement bactérien appréciable.

L'absence de la lyse en de tels milieux ne vient pas de la pauvreté relative de la culture, puisqu'en rendant celle-ci plus abondante par l'addition de petites quantités de glucose, la lyse ne se produit pas davantage. C'est à la raréfaction du milieu en électrolytes qu'est due la suppression de la bactériophagie, comme le prouve la réapparition de celle-ci dès qu'on ajoute des quantités très faibles de chlorure de sodium. Les électrolytes étant nécessaires à la fixation des corpuscules bactériophages sur les bactéries, c'est parce que cette fixation manque lorsque le milieu est trop pauvre en sels, que la lyse ne se produit pas ; les délais d'apparition des cultures secondaires sont d'autant plus courts que le milieu est plus pauvre en électrolytes. Avec le bactériophage staphylococcique Twort qui donne dans les conditions habituelles et en milieux normaux une lyse définitive, on voit donc en milieux dilués apparaître des cultures secondaires, fait déjà intéressant. Mais si l'on ajoute des quantités croissantes de sel, la lyse deviendra plus durable, puis définitive. Cette action des électrolytes, à notre connaissance, n'a encore jamais été signalée.

Inutile de dire que si le chlorure de sodium a été le sel le plus employé dans nos expériences, nous nous étions assurés auparavant que d'autres électrolytes (KCl, MgCl₂, CaCl₂, etc.) agissaient dans le même sens.

L'un des principaux intérêts de la méthode des milieux dilués est, sans conteste, de faire apparaître des différences dans le comportement des divers bactériophages. Dans cette étude, consacrée principalement au bactériophage staphylococcique Twort, nous avons montré combien ce bactériophage est peu exigeant en substances nutritives et en électrolytes. Il est également peu sensible aux fortes concentrations de chlorure de sodium. Nous verrons dans de prochaines études que ce n'est pas le cas pour d'autres bactériophages.

ACTION DES ALCALOÏDES TOTAUX EXTRAITS DES QUINQUINAS DE MADAGASCAR SUR *P. RELICTUM* ET *P. GALLINACEUM*

par P. BARANGER, P. THOMAS et M.-K. FILER.

(Laboratoire de l'Ecole Polytechnique,
Paris et Finedon-Northants.)

INTRODUCTION

L'exposé qui va suivre apporte une contribution à l'étude des alcaloïdes totaux retirés des écorces de quinquina en provenance de Madagascar et décrit l'action de ces alcaloïdes sur *P. relictum* et *P. gallinaceum*.

Plusieurs gouvernements coloniaux attachant de l'intérêt à la production locale d'alcaloïdes totaux — ou « totaquinas » — en vue de la distribution de remèdes bon marché aux masses indigènes impaludées (1).

Nous avons donc cru bon de rassembler quelques indications sur l'efficacité des alcaloïdes totaux et de donner, *in fine*, une bibliographie complète des expériences trop peu connues, exécutées depuis une vingtaine d'années par différents malaria-logistes dans le monde entier, expériences qui justifient dans l'ensemble l'opinion selon laquelle « les alcaloïdes totaux des écorces de quinquina constituent dans le traitement des cas ordinaires de malaria des remèdes de valeur égale, sinon légèrement supérieure, à celle de la quinine », et cela pour les espèces végétales les plus répandues et pour les teneurs les plus variables en quinine.

En fait, les poudres d'écorces ont été, pendant des siècles, le premier remède « total » du paludisme.

Ce remède a de nouveau été employé largement pendant la guerre dans les colonies disposant d'écorces de quinquina. Bien qu'aucune observation rigoureuse n'ait été faite, il semble que les doses d'écorces efficaces correspondent à une posologie en alcaloïdes totaux.

(1) En 1945, 4 tonnes d'alcaloïdes totaux ont été fabriquées à Dar-es-Salam et distribuées gratuitement aux indigènes de l'Est Africain Britannique.

loïdes inférieure à celle usuellement employée pour le sulfate de quinine Codex (2).

Les alcaloïdes totaux ont fait leur apparition en thérapeutique en 1874, aux Indes, où ils ont été employés sur une grande échelle, à l'instigation du Dr J.-E.-J. Vrij, pendant quatorze ans.

La première étude comparative de l'efficacité des quatre principaux alcaloïdes du quinquina, faite par la Commission du Quinquina de Madras (1867-1868), concluait à l'équivalence clinique de ces quatre alcaloïdes. (Voir le tableau ci-dessous.)

Effet des quatre principaux alcaloïdes.

	NOMBRE DE CAS	GUÉRISONS	POURCENTAGE
Quinine	846	840	99,2
Quinidine	1.040	1.025	98,5
Chinchonidine	762	745	97,7
Chinchonine	969	946	97,6

Cependant, il fallait attendre l'expérimentation suscitée par le Comité de la Malaria de la S. D. N. pour que les alcaloïdes totaux

(2) Communication privée du Dr Barasch, Hôpital de la Mission protestante de Bangwa (Cameroun français) : « Traitement du paludisme avec la poudre de Quinquina Ledgeriana. »

Depuis 1940 nous avons eu l'occasion d'utiliser sur plus de 1.000 cas et d'employer exclusivement de l'écorce de quinquina ; le chlorhydrate et le sulfate de quinine étant devenus très rares, nous avons dû traiter nos malades indigènes et quelques européens avec l'écorce. La préparation en était des plus simples : l'écorce brute qui nous a été livrée par le laboratoire de Dschang, était broyée d'abord dans un mortier en bois tel celui que les indigènes emploient pour écraser leur maïs. Le broyage est poursuivi dans des mortiers en porcelaine et on arrive ainsi assez facilement à obtenir une poudre très fine, presque aussi fine que la poudre de talc.

L'écorce de Ledgeriana a été titrée à Dschang : 5 g. de la poudre d'écorce contiennent environ 0,25 g. de quinine base et 0,35 g. d'alcaloïdes totaux. Nous en avons donné 1,5 g. à 2 g. par jour pour un adulte ; cette dose était généralement suffisante pour faire disparaître les hématozoaires dans le sang périphérique.

Nous avons observé que la poudre de quinquina était, d'une manière générale, plus efficace que le sulfate de quinine, la stérilisation du sang périphérique s'obtenait dans un délai de temps plus court. Les malades, souvent cachectiques et présentant des troubles circulatoires, éprouvaient un soulagement rapide et préféraient de beaucoup la poudre d'écorce, malgré les inconvénients de cette dernière : nécessité désagréable d'absorber par voie buccale des quantités considérables, 6 à 8 cuillerées par jour...

du quinquina soient étudiés scientifiquement par de nombreux malarialogistes : Sinton [1] ; Field [2] ; Parvulescu et Boeriu [3] ; Schwetz et Baumann [4] ; Société des Nations [5, 14] ; Slatineanu, Ciuca, Balteanu, Alexa, Francke et Rugina [6] ; Yao et Yung [7] ; Hicks et Chand Diwan [8] ; Maranon, Perez et Russell [9] ; Maldonado Sampedro [10] ; Ejercito et Santos [11] ; Kingsbury [12] ; Miyahara [13] ; Goré [15] ; Wijerana [16] ; Science [17] ; Green [18] ; Raymond [19] ; East African Med J. [20]

Les expériences rapportées dans le présent mémoire portent sur les extraits alcaloïdiques totaux d'écorces de *Cinchona officinalis*, *C. succirubra*, *C. ledgeriana* en provenance de la station de Mandraka et de la Montagne d'Ambre à Madagascar.

Bien que les résultats thérapeutiques obtenus sur la malaria des oiseaux ne soient pas entièrement transposables dans la malaria humaine, il est admis que dans la plupart des cas, le classement des activités thérapeutiques des produits appartenant à une même série chimique, est analogue dans les expérimentations sur l'animal et sur l'homme.

Quelques auteurs ont étudié l'action des alcaloïdes du quinquina dans la malaria des oiseaux : Sergent, Sergent et Vogt [21] ; Giemsa [22] ; Buttle, Henry et Treven [23] ; Baranger et Thomas [24] ; Seeler, Busenberg et Malanga [25].

Buttle, Henry et Treven comparent par la méthode de Roehl, l'action des différents alcaloïdes avec celle de la quinine dans la malaria des oiseaux. En général, pour obtenir la même action que la quinine, il convient d'employer les autres alcaloïdes en doses plus fortes.

Giemsa a comparé l'action des différents totaquinins avec celle de la quinine, par la technique de Roehl. Malheureusement, il utilise des doses très faibles, de six fois 1 mg. et le classement ainsi obtenu n'est guère significatif, ces doses étant éloignées de la région des doses thérapeutiques. L'expérience montre qu'en augmentant les doses le classement peut changer (Baranger et Thomas, Loc. cit).

Dans ces deux expériences, le délai d'apparition des parasites dans le sang périphérique, sert de mesure à l'efficacité des produits.

Et. et Edm. Sergent communiquent, sur l'activité générale des différents alcaloïdes, les résultats les plus intéressants qui ont été publiés en ce qui concerne la malaria des oiseaux et les alcaloïdes du quinquina ; ils montrent que ces derniers possèdent des actions variées sur les différents symptômes de la maladie, actions qui semblent se compléter ; ces auteurs n'étudient pas les mélanges totaux.

Baranger et Thomas comparent l'action des différents extraits totaux des quinquinas du Cameroun et du Congo Belge avec la

quinine. L'expérience porte sur les produits industriels et de laboratoire. La conclusion générale est que ces extraits sont, sur *P. relictum*, équivalents ou supérieurs à la quinine.

Seeler, Dusenbery et Malanga expérimentent sur des totaquinas et sur les principaux alcaloïdes, afin de déterminer l'importance d'une diminution du pourcentage de quinine (jusqu'à 7 %) dans les totaquinas (diminution admise dans un supplément récent du Codex américain, afin de rendre possible l'utilisation des totaquinas extraits des écorces d'Amérique du Sud). Ces auteurs travaillent sur *P. lophuræ* et concluent :

- a) Que les alcaloïdes ont la même activité sur *P. lophuræ*.
- b) Que deux échantillons de totaquinas différant largement par leur teneur en quinine sont aussi actifs que la quinine.
- c) Qu'il n'y a pas de différence entre les toxicités des quatre alcaloïdes sur la souris par voie buccale, mais que la quinoïdine est plus toxique que les alcaloïdes cristallisés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Les extraits totaux ont été préparés dans notre laboratoire par la méthode classique : Traitement des écorces — (il s'agit d'écorces vieilles de quelques mois seulement) — par un mélange de chaux et de soude, extraction au Soxhlet par le trichloréthylène, redissolution par ClH dilué et précipitation par NaOH, reprise par le trichloréthylène.

Ces extraits peuvent être considérés comme contenant la totalité des alcaloïdes à l'état pur. Les teneurs des écorces en alcaloïdes totaux et en quinine ont été déterminées par la méthode suivante :

MÉTHODE DE DOSAGE.

Mélanger soigneusement au mortier 10 g. d'écorce pulvérisée, passant au tamis n° 60 (maille de 0,25 mm.) avec 3 g. de chaux hydratée finement pulvérisée et y ajouter ensuite 10 cm³ de soude N.

Introduire le mélange dans une cartouche de Soxhlet et l'épuiser dans cet appareil pendant huit heures avec le trichloréthylène.

Évaporer le solvant à sec au B. M. bouillant. Traiter soigneusement le résidu à froid avec une fois 10 cm³ et trois fois 5 cm³ d'acide chlorhydrique normal ; filtrer ces différents liquides sur un petit filtre dans une ampoule à décanter ; laver une dernière fois avec 10 cm³ d'eau.

Alcaliniser par un excès de lessive de soude 10 N. (environ 3 cm³) ; filtrer ces différents liquides sur un petit filtre dans une ampoule à décanter ; laver une dernière fois avec 10 cm³ d'eau.

Alcaliniser par un excès de lessive de soude 10 N. (environ 3 cm³) ; épuiser quatre fois avec 40 cm³ de trichloréthylène. Réunir les liquides dans un ballon à distiller de 250-350 cm³ ; évaporer à sec au B.M. ; ajouter 10 cm³ de méthanol pur, évaporer au B. M. et éliminer les dernières traces de solvant sous vide à la trompe à eau.

Reprendre le résidu sec par 5 cm³ d'acide chlorhydrique N, filtrer dans une ampoule à décanter et laver ballon et filtre trois fois avec 5 cm³ d'eau.

Alcaliniser par un excès de soude N (6 à 7 cm³) et épuiser quatre fois avec 25 cm³ de trichloréthylène. Filtrer les liquides d'épuisement sur filtre préalablement imbibé de trichloréthylène, dans un ballon à distiller.

Evaporer à sec au B. M., terminer à la trompe à vide.

Reprendre le résidu par environ 10 cm³ de méthanol, introduire cette solution dans un ballon à distiller taré de 50 cm³, laver trois fois avec environ 5 cm³ de méthanol et ajouter ces liquides au premier.

Evaporer au B. M. puis terminer sous vide jusqu'à poids constant. Peser. La différence de poids trouvée, multipliée par 10 donne la teneur en alcaloïdes totaux de 100 g. d'écorces N. B.

Tare du ballon : Rincer trois fois le ballon, contenant un petit grain de terre poreuse, avec quelques gouttes de méthanol, le sécher au B. M. sous vide. Séparer le ballon, essuyer soigneusement l'extérieur et le tarer après refroidissement (environ 10 à 15 minutes) sur une balance sensible au milligramme.

Dosage de la Quinine : Reprendre les alcaloïdes totaux par un minimum d'acide sulfurique N. (4 cm³ environ pour 1 g.) Transvaser dans un Erlenmeyer, laver le ballon trois fois à l'eau distillée de manière à avoir un volume final d'environ 50 cm³ pour chaque gramme d'alcaloïde. Chauffer près de l'ébullition et ajouter lentement, en agitant constamment, jusqu'à une acidité juste perceptible au tournesol, ou plus précisément à un pH d'environ 5-6 à l'indicateur universel. Laisser refroidir deux heures à 15° ; filtrer sur double filtre, les deux filtres ayant été préalablement équilibrés, dans une éprouvette graduée ; laver soigneusement Erlenmeyer et filtres avec de l'eau à 15° de manière que le volume total du filtrat soit d'environ 70 cm³. Sécher les deux filtres à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant, le filtre inférieur étant utilisé comme contre-poids.

Ajouter au poids trouvé 0,00082 g. pour chaque cm³ de filtrat, multiplier cette somme par 8,7 (spécifiquement pour 10 gr.). Le résultat trouvé est le poids de quinine base provenant de 100 g. d'écorce.

Tous les résultats sont exprimés en alcaloïdes ou en quinine base.

Les teneurs en alcaloïdes totaux et quinine des écorces examinées sont indiquées dans le tableau suivant :

a) ACTION SUR *P. relictum*. — La méthode suivie est celle décrite par Baranger et Thomas (*loc. cit.*). On a utilisé une souche de *P. relictum* provenant du laboratoire du professeur Keilin de Cambridge ; les oiseaux employés étaient des canaris. Bien que n'étant pas de race unique, ils ont donné une réponse constante à l'infection : la malaria était transmise par inoculation directe, d'oiseau à oiseau.

Le sang était prélevé par section de la tête d'un oiseau présentant une infection aiguë, et recueilli dans un égal volume de solution saline citratée (NaCl, 0,8 p. 1.000 ; citrate de Na, 2 p. 100).

Composition des écorces.

ESPECES	STATION BOTANIQUE	POURCENTAGE en alcaloïdes totaux	POURCENTAGE en quinine
<i>C. ledgeriana</i> , n° 1 (1)	Montagne d'Ambre.	5,05	2,8
<i>C. ledgeriana</i> , n° 3 . .	Mandraka.	6,75	5,2
<i>C. succirubra</i> , n° 2 . .	Montagne d'Ambre.	10,2	4,5
<i>C. succirubra</i> , n° 4 (1).	Mandraka.	5,7	2,8
<i>C. officinalis</i>	Mandraka.	7,65	2,4

(1) Ces échantillons n'ont pas été examinés au point de vue thérapeutique, en raison de leur faible teneur en alcaloïdes.

Chaque oiseau recevait 0,25 cm³ de sang dilué, par injection dans le muscle pectoral. L'examen du sang des oiseaux ainsi infectés a été commencé régulièrement le quatrième jour après l'infection.

Les lames étaient colorées au Giemsa et pour chaque lame, 30 champs au minimum, ont été examinés.

Les alcaloïdes ont été administrés par voie buccale, sous forme de petites boulettes, préparées par mélange d'une partie d'alcaloïdes avec 9 parties de farine et un peu d'eau. Chaque boulette contient la dose d'alcaloïdes (à l'état de bases) requise pour un test sur un oiseau.

L'expérience a montré que les boulettes sont facilement avalées et que cette méthode était plus pratique que l'administration par cathéter (Fourneau [26]).

La méthode adoptée pour examiner la valeur thérapeutique d'un nouveau produit était la suivante :

Quatre ou six heures après l'inoculation de sang parasité, on administre la première dose d'alcaloïdes qui est suivie de 5 autres doses à vingt-quatre heures d'intervalle. Pour chaque expérience 2 oiseaux témoins sont conservés sans traitement.

Les oiseaux choisis pour chaque test pesaient approximativement le même poids et ils ont reçu des doses uniformes.

Dans ces conditions, l'expérience a montré que l'apparition des parasites ne dépendait pas du poids des oiseaux ni chez les témoins ni chez les oiseaux traités.

Toutes les expériences rapportées ici ont été faites avec des doses de 3,5 mg. qui donnent ordinairement un bon effet thérapeutique, sans effet toxique, dans la série des alcaloïdes du quinquina (Baranger et Thomas, *loc. cit.*).

Il est d'usage de prendre comme mesure de l'efficacité d'un

remède, le délai manifesté dans l'apparition des parasites dans le sang périphérique.

Nous avons apporté de légères modifications à cette règle et adopté la méthode suivante : l'action d'un remède déterminé, sur une série d'oiseaux, est représentée par un graphique simple, indiquant chaque jour par des cases hachurées ou claires, si le sang est parasité ou non.

L'évolution de l'infection chez un oiseau non traité sera repré-

PRODUITS	DOSES en mg.	JOURS 5 10 15 20	INFECTIONS AIGUES	VALEURS STÉRILISANTES
TÉMOINS			5/6	0
QUININE (6 h.)	3,5		1/5	4,5
QUININE (4 h.)	3,5		0/5	6,7
Alc. totaux SUCCIRUBRA N°2 (6 h.)	3,5		2/7	5,7
SUCCIRUBRA N°2 (4 h.)	3,5		1/2	3,7
Alc. totaux LEDGERIANA N°3 (6 h.)	3,5		0/5	6,9
LEDGERIANA N°3 (4 h.)	3,5		1/2	9,7
Alc. totaux OFFICINALIS N°5 (6 h.)	3,5		5/7	3,3
OFFICINALIS N°5 (4 h.)	3,5		1/2	3,2

sentée par un graphique analogue. On remarque dans certaines expériences (quinine) une apparition précoce de parasites isolés, qui disparaissent ensuite pendant plusieurs jours. Il serait peu significatif, à notre avis, de tenir compte seulement de la première apparition des parasites pour évaluer la valeur thérapeutique d'un produit ; c'est pourquoi nous suggérons de considérer l'évolution parasitaire pendant une durée de vingt jours et de compter combien on trouve de jours sans parasites pendant cette période. On obtient ainsi pour chaque série, en rapportant ce nombre total à un seul oiseau, un nombre, duquel on retranchera

le nombre obtenu pour la série d'oiseaux témoins. De là un ensemble d'indices thérapeutiques représentant les valeurs stérilisantes des différents remèdes.

On voudra bien placer en face de cet indice la proportion d'infections aiguës observées dans chaque série d'expériences. Une infection est appelée aiguë lorsque le nombre des parasites a dépassé 10 par champ, au cours de l'infection.

Finalement, tous les résultats obtenus dans une série d'expériences peuvent être rassemblés dans un seul tableau (fig. ci-contre).

b) ACTION SUR *P. gallinaceum*. — La technique utilisée est, sauf quelques légères modifications, celle décrite par Curd, Davey et Rose [27]. La souche de *P. gallinaceum* a été gracieusement fournie par le Dr D.-G. Davey, de l'Imperial Chemical Industries Ltd, Hexagon House, Manchester.

Les poulets utilisés sont tous de même race. Les oiseaux nés le mardi ont été mis en expérience le lundi suivant.

On doit disposer pour l'infection, de donneurs présentant une infection aiguë obtenue en infectant ces donneurs le vendredi précédent par une injection de 100 millions de parasites. Pour opérer le passage de l'infection, soit dans les donneurs, soit chez les oiseaux soumis à l'expérimentation, on opère de la façon suivante :

Les donneurs sont sacrifiés par section de la tête, et le sang recueilli dans un volume de liquide citraté (NaCl 0,08 p. 1.000 ; citrate de Na 2 p. 100) environ double du volume de sang (un oiseau donne de 2 à 3 cm³ de sang) le sang ainsi dilué est soumis à une numération globulaire ; pendant ces opérations, une lame de sang pur a été colorée au Giemsa et permet d'évaluer le pourcentage de corpuscules parasités (en général environ 75-85 p. 100). On ajoute alors au sang citraté la quantité de liquide citraté nécessaire pour avoir environ 250 millions de corpuscules parasités dans chaque cm³ de la dilution.

Pour infecter de nouveaux poulets, on injecte dans la veine jugulaire 0,2 cm³ de la dilution ainsi préparée, s'il s'agit de préparer les oiseaux soumis à l'expérience (le lundi), et 0,4 cm³ s'il s'agit de préparer (le vendredi) des donneurs ayant une infection aiguë le quatrième jour après l'infection.

L'injection peut avantageusement être faite en utilisant une aiguille courbée et une seringue de 1 cm³. L'opération peut alors être faite par une seule personne.

Les remèdes sont administrés en sept fois. La première fois le lundi, quatre heures après l'infection, et deux fois par jour les mardi, mercredi et jeudi. Les remèdes sont administrés sous la forme de boulettes. Ces boulettes sont préparées en ajoutant un peu d'eau à un mélange homogène de farine et de produit (10 p. 100 de produit ou moins).

PRODUITS	DOSES en milligrammes	NOMBRE de parasites le 5 ^e jour	MOYENNES
Quinine.	0,75	17 16 62 28 51	34,8
	1,0 (1)	26 59 65 37 29 43	43,16
<i>Succirubra</i> , n° 2. Alcaloïdes totaux	0,75	25 4 5 27	15,25
	1,0	15 16 28 12 14	17,0
<i>Ledgeriana</i> , n° 3. Alcaloïdes totaux.	0,75	38 66 58 52 73 34	53,5
	1,0	4 33 42 38 17	26,8
<i>Officinalis</i> , n° 5. Alcaloïdes totaux.	0,75	63 221 131 228 167 106	152,6
	1,0	26 41 23 16 9 29	24,0

(1) CURD, DAVEY et ROSE (*loc. cit.*) donnent les chiffres suivants pour l'activité de la mépacrine (atébrine), employée à la dose de 1 mg. par 50 g. sur *P. gallinaceum*.

PRODUITS	DOSES en milligrammes	NOMBRE de parasites le 5 ^e jour	MOYENNES
<i>Succirubra</i> , n° 2. Ecorces.	0,75	323 406 291 358 413 102	315,8
<i>Ledgeriana</i> , n° 3. Ecorces.	0,75	141 83 68 264 173 62	131,8
<i>Officinalis</i> , n° 5. Ecorces.	0,75	89 40 103 189 168 209	133,0
Contrôle.		341 453 316 385 298 429	370,3

NOMBRE DE PARASITES le 5 ^e jour	MOYENNE	MOYENNE DES CONTROLES
170	120	302
68		
26		
32		
176		
248		

Les poulets d'un même lot doivent peser le même poids, soit environ 50 g. (+ ou — 5 g.). Si l'on opère sur des poulets plus petits ou plus gros, il convient de modifier les boulettes en conséquence.

L'expérience montre que dans ce mode d'administration, la fidélité des réponses est excellente et qu'on obtient les mêmes résultats qu'avec l'administration par cathétère. Cette dernière méthode a l'inconvénient d'exiger pour les produits insolubles la mise en suspension préalable dans un milieu dispersif.

Le mercredi on fait un examen, après coloration au Giemsa, du sang de tous les oiseaux, afin de suivre la marche de l'infection et de vérifier que tous les oiseaux ont bien été infectés par voie intraveineuse. Si l'injection infectante n'a pas été faite dans la veine, les parasites n'apparaissent pas dans le sang périphérique avant le huitième jour.

Le vendredi, le sang des oiseaux est examiné, afin de déterminer la proportion de corpuscules parasités. On compte 500 corpuscules.

Le nombre des corpuscules parasités sert d'indice pour l'activité thérapeutique des différents remèdes.

L'expérience est terminée.

Le tableau précédent rassemble les résultats obtenus avec cette méthode en comparant la quinine (1), les alcaloïdes totaux de *C. succirubra*, *C. ledgeriana* et *C. officinalis*, ainsi que les poudres d'écorces correspondantes. Les doses employées sont de 0,5 mg. et 1 mg. pour chaque administration de remède.

A titre d'indication, nous donnons les résultats obtenus avec 1 mg. d'atébrine, par Curd, Davey et Rose (*loc. cit.*).

CONCLUSION

a) L'ensemble des expériences sur *P. relictum* et *P. gallinaecum* est cohérent.

b) Les résultats obtenus avec les alcaloïdes de *C. officinalis* (*P. gallinaecum*) suggèrent, comme il a déjà été signalé par Baranger et Thomas (*loc. cit.*), que le classement varie en fonction des doses.

c) Les écorces en poudre ne paraissent pas être absorbées ni utilisées régulièrement par les poulets comme elles le sont par l'homme.

d) D'une façon générale, il apparaît que lorsqu'on utilise les doses thérapeutiques — qui sont très voisines les unes des autres pour les différents alcaloïdes totaux ou purs, — les activités thérapeutiques dans la malaria aviaire sont comparables entre elles. Cette proposition n'est pas très différente de celle écrite au début de cet article pour résumer les travaux des différents malaria-logistes sur l'action des alcaloïdes totaux ou purs, dans la malaria humaine.

e) Dans les conditions expérimentales choisies, il apparaît que l'action des alcaloïdes totaux est de même ordre que celle de la quinine. Rien ne permet de classer la quinine à part, ni en

(1) La quinine employée est de la quinine base pure :

$\alpha_D^{15} = -281.$

tête. Au contraire, l'activité de cet alcaloïde, dans les deux séries d'expériences, se trouve légèrement inférieure soit à celle des alcaloïdes de *Ledgeriana* (*P. relictum*), soit à celle des alcaloïdes de *Succirubra* (*P. gallinaceum*).

Du point de vue économique et au point de vue de l'hygiène sociale des immenses masses indigènes impaludées, il semble que la comparaison des différents remèdes extraits des quinquinas, devrait être faite en se basant sur le prix de revient du kilo d'écorces.

Dans cette perspective, les écorces robustes, faciles à acclimater en culture indigène, telles que le *Succirubra*, apparaîtraient singulièrement intéressantes, ainsi que le signale Raymond (*loc. cit.* (1)).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SINTON (J. A.). *Rec. Malar. Surv. India*, 1929, 4, 1.
- [2] FIELD (J. W.). *Malayan med. J.*, 1934, 9, 26.
- [3] PARVULESCU (C. W.) et BOERIU (V.). *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 1934, 7, 523.
- [4] SCHWETZ (J.) et BAUMANN (H.). *Riv. de Malarialogia*, 1934, 13, 353.
- [5] et [14] SOCIÉTÉ DES NATIONS. *Quart. Bul. Hlth. Org.*, 1934, 3, 325.
Fourth General Report of the Malaria Com. Geneva, League of Nations, 1937, 21.
- [6] SLATINEANU (A.), CIUCA (M.), BALTEANU (I.), ALEXA (E. I.), FRANCKE (M.) et RUGINA (I.). *Bul. Soc. Path. Exot.*, 1934, 8, 723.
- [7] YAO (Y. T.) et YUNG SUN (C.). *Trans. Far. East. Ass. Trop. Med.*, 1934, 2, 281.
- [8] HICKS (E. P.) et CHAND DIWAN. *Rec. Malar. Surv. India*, 1935, 5, 39.
- [9] MARANON (J.), PEREZ (A.) et RUSSELL (P. F.). *Philipp. J. Sci.*, 1935, 56, 229.
- [10] MALDONADO SAMPEDRO (M.). *Medicina Paisas Calidos*, Madrid, 1936, 9, 353.
- [11] EJERCITO (A.) et SANTOS (G. O.). *Mon. Bull. Bur. Hlth.*, Manila. 1937, 47, 219.
- [12] KINGSBURY (A. N.). *Annual Report of the Malaria Advisory Board for the year, 1936* ; Kuala Lumpur, F. N. S. : Govt. Press., 1937.
- [13] MIYAHARA (H.). *J. Med. Ass. Formosa*, 1938, 36, 395.
- [14] voir [5].

(1) A titre d'indication les plantations de quinquina *Succirubra* produisent en moyenne trois fois plus d'écorces que celles de *Ledgeriana* par hectare et par an, soit environ 2 tonnes. En 1945, les planteurs indigènes cultivant des terres à quinquina, mais pour la culture du café (beaucoup plus pénible que celle du quinquina *Succirubra*), retiraient au maximum 6.000 francs par hectare et par an, de leur terrain comme récompense de leur travail. Ceci donne une idée de ce que pourrait être le prix de revient réel des écorces de quinquina au Cameroun.

- [15] GORE (R. N.). *Indian Med. Gaz.*, 1938, **37**, 608.
- [16] WIJERANA (E. M.). *J. Ceylon Br. Brit. Med. Ass.*, 1939, **36**, 403.
- [17] *Science*, 1942, **96**, 10.
- [18] GREEN (R. A.). *Bull. U.S. Army Med. Dept.*, 1945, **84**, 51-57.
- [19] RAYMOND (W. D.). *East African Med. j.*, 1944, **21** n° 10, 291-297.
- [20] *East African Med. J.* 1944, **21** n° 10, 289-291.
- [21] SERGENT (Ed.), SERGENT (Et.) et VOGT (E.). *Arch Inst. Pasteur*, Alger, 1923, **1**, 270.
- [22] GIEMSA (G.). *Riv. Malarial*, 1933, **12**, 70.
- [23] BUTTLE (G. A. H.), HENRY (T. A.) et TREVAN (J. W.). *Biochem. J.* 1934, **28**, 246.
- [24] BARANGER (P.) et THOMAS (P. E.). *Bioch. J.*, 1943, **37**, 342.
- [25] SEELER (A. O.), BUSENBERRY (E.) et MALANGA (C.). *J. Pharm. and Exper. Therap.*, 1943 **78**, n° 2, 159-163.
- [26] FOURNEAU (E.), TRÉFOUËL (M.), TRÉFOUËL (M. N.), STÉFANOPOULO (G.), BENOIT (G.), LESTRANGE (Y.) et MELVILLE (K. I.). *Ces Annales*, 1930, **44**, 504.
- [27] CURD (F. S. H.), DAVEY (D. G.) et ROSE (F. L.). *Ann. Trop. Med. a. Parasit.*, 1945, **39**, 139-156.

SUR LE DOSAGE ET LA CHIMIE DE L'ÉTHANAL ET DE SES COMBINAISONS DANS LES VINS ET LES ALCOOLS

par MM. J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD.

I. — INTRODUCTION.

Les questions relatives à l'éthanal ou acétaldéhyde, ou aldéhyde éthylique, ou encore aldéhyde acétique (CH_3CHO), à sa présence et à ses réactions dans les milieux fermentés et notamment dans les vins, à ses dérivés, à son dosage, constituent un important problème, qui a fait l'objet notamment de deux mémoires parus dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, sous les signatures de Trillat en 1908 (1) et de Laborde en 1917 (2). Les origines multiples de l'éthanal, sa grande facilité de réaction, ses propriétés organoleptiques, donnent un grand intérêt à la connaissance des phénomènes se rapportant aux composés aldéhydiques. L'éthanal apparaît au cours de la fermentation alcoolique des sucres en anaérobiose par la levure, de même que dans les phénomènes de déshydrogénation respiratoire sous l'action des bactéries acétiques et des levures mycodermiques ; produit d'oxydation de l'alcool, sa présence dans les vins est encore intimement liée aux phénomènes d'oxydation par l'oxygène atmosphérique et par conséquent à la conservation et au vieillissement des vins. Il faut souligner que le groupement fonctionnel CHO est parmi les plus riches en affinités chimiques.

Dans la pratique habituelle de la conservation des vins, l'éthanal n'existe que tout à fait accidentellement et temporairement à l'état libre. Il leur donne dans ce cas le caractère du « mâché », de l'évent. D'ailleurs l'éthanal libre produit dans un vin ou ajouté expérimentalement en petite quantité, disparaît rapidement avec des destinations diverses, surtout si le vin n'est pas stérile.

Du fait de l'emploi général du gaz sulfureux comme antiseptique dans la vinification et les soutirages, la combinaison sulfite de l'éthanal ou acide aldéhydesulfureux ou encore éthanol-sulfonique ($\text{CH}_3\text{CHOH.SO}_3\text{H}$), combinaison très stable en milieu acide, est la forme la plus générale de sa présence dans cette

(1) A. TRILLAT, ces *Annales*, 1908, **22**, 704, 753 et 876.

(2) J. LABORDE, ces *Annales*, 1917, **31**, 215.

boisson. Il est très utile de connaître les rapports entre l'éthanal et l'acide sulfureux pour bien comprendre le comportement de cet antiseptique dans les boissons fermentées.

Le présent travail est une contribution analytique à l'étude de la chimie de l'éthanal dans les milieux de fermentation, vins et alcools. Reprenant l'expérimentation des auteurs précités d'une manière plus précise, il corrige certains points de vue et rend compte des phénomènes avec plus d'exactitude.

II. — MÉTHODE JAULMES ET ESPEZEL POUR LE TITRAGE DE L'ÉTHANAL.

De nombreuses méthodes de dosage de ce corps, fondées sur les réactions caractéristiques du groupement CHO, ont été proposées. Leur spécificité ne s'applique d'ailleurs en réalité qu'à la fonction aldéhydique ; elles ne peuvent donner que la somme des diverses aldéhydes volatiles d'un milieu. La complexité d'un liquide comme le vin ou son distillat, dans lesquels en outre les fonctions aldéhydiques ne sont pas toujours libres et se présentent à un état de grande dilution, s'opposent à l'emploi des méthodes de précipitation avec caractérisation du précipité obtenu avec la phénylhydrazine, la dinitrophénylhydrazine, le dimédon, etc., qui permettent de distinguer dans une certaine mesure les aldéhydes homologues. D'ailleurs, dans le vin, l'éthanal représente la quasi totalité des aldéhydes volatiles. Le méthanal ou formol (H.CHO), les aldéhydes supérieures, le furfural, le méthoxyfurfural, sont des produits accidentels du vin ou y existent seulement à l'état de traces.

Trillat et Laborde titraient l'éthanal par la méthode colorimétrique au bisulfite de rosaniline, avec la formule indiquée par Gayon. Elle est très inexacte en présence d'acide sulfureux. Cette méthode n'est applicable que lorsque l'éthanal du milieu est à l'état libre ; la précaution indiquée par Laborde de recueillir le distillat dans le réactif pour empêcher une recombinaison de SO_2 et de l'éthanal distillé, n'est pas suffisante, cette recombinaison s'effectuant déjà en partie dans le serpentin du réfrigérant.

Parmi les nombreuses méthodes volumétriques proposées, nous retiendrons celles que Jaulmes et Espezel ont publiée en 1932 et 1935 (3). Ces auteurs ont étudié d'une façon méthodique et très détaillée, le titrage de l'éthanal en solution simple, et ont pu donner une méthode iodométrique beaucoup plus rigoureuse que les précédentes. Elle est un bon exemple d'une technique fondée non par des tâtonnements empiriques, mais sur une étude systé-

(3) P. ESPEZEL, L'acétaldéhyde dans les vins et les spiritueux. *Thèse Pharmacie*, Montpellier, 1932. P. JAULMES et ESPEZEL. *Ann. Falsif. Fraudes*, 1935, 28, 325.

matique préalable, recherchant les meilleures conditions des réactions en jeu. Il est dommage que les auteurs n'aient pas poursuivi une étude aussi bien conduite à la séparation de l'éthanal par distillation.

Dosage en solution simple. — Jaulmes et Espezel ont recherché les conditions optima de la combinaison sulfite-éthanal : si on place l'éthanal en milieu tamponné de pH 7 en présence d'un large excès de sulfite, la réaction complète ne demande pas plus d'une vingtaine de minutes, même en solution très diluée (en milieu acide elle est plus lente bien que complète ; en milieu alcalin elle est plus lente et incomplète). Les conditions optima de stabilité (milieu acide) et d'instabilité (milieu légèrement alcalin), qui permettent le titrage iodométrique de la combinaison éthanosulfonique, ont été définies : l'acide sulfureux libre est oxydé en milieu acide ; ainsi on ne risque pas de détruire une partie, même minime de la combinaison. L'acide sulfureux combiné à l'éthanal est titré en solution boratée vers pH 8,5-9, pour lequel le sulfite est rapidement libéré au fur et à mesure que s'effectue l'oxydation de la portion dissociée. La grande instabilité de la combinaison à ce pH permet son titrage direct par l'iode avec un virage beaucoup plus net que lorsqu'on emploie le bicarbonate de sodium (proposé par Tomoda).

Nous indiquerons les solutions nécessaires au dosage de l'éthanal, employées par Jaulmes et Espezel, et nous donnerons la description du mode opératoire avec de légères modifications et précautions.

1° Solution tampon de pH 7,0 : 15 g. de PO_4HNa_2 , 12 H_2O et 3,35 g. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ par litre.

2° Solution de bisulfite de sodium à 20 g. par litre, que l'on peut préparer ainsi : sulfite de sodium pur et sec : 18,9 g ; $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$, 150 cm^3 et eau distillée q. s. pour 1.000 cm^3 .

3° Solution acide : ClH à 22° Bé dilué au quart par de l'eau distillée.

4° Solution alcaline : 30 g. d'acide borique, 40 g. de NaOH par litre (solution plus concentrée que celle indiquée par les auteurs).

5° Liqueurs d'iode titrées.

On place dans un flacon conique 25 cm^3 de la solution à pH 7, puis 5 cm^3 de la solution de bisulfite et une prise de solution d'éthanal qui en contient par exemple une centaine de micromolécules (quelques milligrammes). En faisant varier la concentration de la liqueur d'iode titrée, on peut titrer directement de 10 micromolécules à une millimolécule d'éthanal. On laisse en contact pendant quinze à vingt minutes. Pratiquement lorsqu'on sépare l'éthanal par distillation, on reçoit le distillat dans le tampon phosphaté et sulfité ; la combinaison s'effectue au cours de la distillation et on peut titrer sans attendre. Le milieu additionné d'empois d'amidon est acidifié par 5 cm^3 de la solution acide. Nous trouvons commode d'oxyder l'excès de SO_2 à l'état libre par une solution d'iode un peu concentrée (20 g. par litre),

versée à l'aide d'une burette, la fin du virage étant obtenue avec l'iode N/10 ou N/100 suivant les cas.

On ajoute alors 1 goutte de solution alcoolique de phénolphthaléine et le volume nécessaire de solution alcaline pour donner au liquide une légère teinte rose (25 cm³ environ) ; la coloration bleue de l'iodure d'amidon disparaît et on titre par la solution décimale ou centimale d'iode, jusqu'à coloration bleue violette. Il faut diluer les milieux très alcoolisés ; l'empois prend en présence d'alcool une couleur violette terne qui ne permet pas un virage aussi net que la franche couleur bleue en solution aqueuse.

Pour les calculs, deux équivalents d'iode correspondent à un équivalent d'éthanal ; par exemple 1 cm³ de solution d'iode N/100 correspond à 0,22 mg. d'éthanal dans la prise d'essai.

La précision de la méthode est très grande et, en prenant certaines précautions, l'erreur ne dépasse pas 1 p. 100. Il est nécessaire par exemple que le titrage suive immédiatement l'addition de la solution alcaline de borate ; cette précaution est importante dans les dosages en série pour lesquels on a tendance généralement à alcaliniser les liquides tous à la fois ; une attente de cinq minutes provoque une perte d'environ 5 p. 100, due à l'oxydation très rapide en milieu alcalin.

Les mêmes auteurs ont appliqué la méthode de tirage au dosage de l'éthanal dans les boissons alcooliques et les spiritueux. Mais comme nous l'avons dit, l'étude de la distillation de l'éthanal et des divers états sous lesquels il peut se trouver dans ces milieux, n'a pas été abordée. Les auteurs opèrent la distillation en recueillant la moitié du volume, après acidification par 5 p. 100 en volume d'acide phosphorique sirupeux (à 85 p. 100), c'est-à-dire comme jusqu'à ce jour la plupart des analystes, depuis Trillat, l'ont proposée.

III. — ETUDE DE LA SÉPARATION DE L'ÉTHANAL ET DE SES COMBINAISONS DANS LES VINS.

Comme il a été déjà indiqué, l'éthanal peut se trouver dans les vins sous divers états : à l'état libre, sous forme d'acide aldéhyde-sulfureux, et encore, mais plus rarement, sous forme de combinaison d'addition avec les polyphénols du vin. Les diverses propriétés de l'éthanal libre et combiné et sa séparation par distillation, seront envisagées successivement.

Ethanal libre. — L'éthanal est un corps très volatil ; en solution très diluée, sous pression normale, il distille complètement avec le premier dixième du volume, de même que l'ont constaté Jaulmes et Tixier (4). Il est prudent pour éviter les pertes de

(4) P. JAULMES, *Analyse des Vins*. Dubois et Poulain, Montpellier, 1942, 289.

produit de faire plonger au début de la distillation le tube d'arrivée du réfrigérant dans le liquide tampon sulfité.

Quelques méthodes récentes de séparation (Friedman, Perdigon, Shinn et Nicolet) emploient pour entraîner l'éthanal, un courant d'air ou de CO_2 traversant, souvent pendant plusieurs heures, la solution à l'ébullition. Ces procédés ne sont pourtant pas plus exacts que la distillation simple et rien ne justifie à notre avis ce mode opératoire ; l'éthanal risque d'être entraîné du distillat avant d'être capté par le sulfite ; les auteurs emploient pour le retenir des flacons laveurs ou des tubes à billes de verre.

Acide aldéhydesulfureux. — En réalité, l'éthanal libre est assez rare dans les vins normaux et c'est sous forme de combinaison sulfiteuse qu'il se trouve dans ces liquides, ainsi que l'ont indiqué Schmitt (1892) et Ripper (1890-1895), et comme le démontra Kerp en 1904 (5).

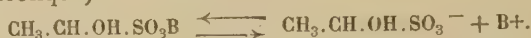
Ce dernier auteur, dans une série de travaux (1904-1909), a encore étudié la cinétique et la statique de la combinaison de l'éthanal et de l'acide sulfureux en quantités équimoléculaires en solution aqueuse. La combinaison est incomplète et réversible : dans une solution 1/30 moléculaire d'acide aldéhydesulfureux (2,1 g. de SO_2), 0,71 p. 100 demeure à l'état libre à la température ordinaire ; à 37° la fraction libre en équilibre est trois fois plus importante. La combinaison n'est complète qu'en présence d'un excès de SO_2 libre, ce qui est généralement le cas de la pratique, tout au moins pour les vins blancs. En concentration plus diluée, l'hydrolyse est plus importante ; on ne possède pas de documents chiffrant l'hydrolyse pour des concentrations vingt fois plus faibles, qui sont celles rencontrées dans le vin ; il est vraisemblable que lorsqu'il n'y a pas d'excès de SO_2 libre, 2 à 3 p. 100 de l'éthanal du vin peuvent se trouver à l'état libre.

L'acide aldéhydesulfureux est un acide fort, qui serait même plus fort que la première fonction de l'acide sulfureux (pH 1,4), donc entièrement dissocié dans le vin et s'y trouvant entièrement salifié. Autre conséquence : l'addition d'éthanal à un vin possédant une forte teneur en acide sulfureux libre (200 mg.) abaisse nettement le pH, ainsi qu'il a été observé sur deux vins : le pH est tombé de 2,96 à 2,84 pour le premier, de 3,31 à 3,17 pour le second.

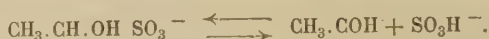
Par suite de la réversibilité de la réaction et de la dissociation électrolytique, il existe dans une solution aqueuse d'acide aldéhydesulfureux un système assez compliqué d'équilibres, qui sont les suivants :

(5) Au sujet de l'acide aldéhydesulfureux, voir : Th. PAUL, *Nahrungsmittelchemie mit besonderer Berücksichtigung der modernen physikalisch-chemischen Lehren*, Leipzig, 1914, 94 et C. VON DER HEIDE et F. SCHMITTFENNER, *Der Wein*, Vieweg, Brunswick, 1922, 145.

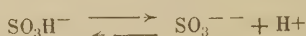
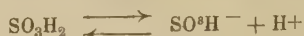
1. Dissociation électrolytique des aldéhydesulfites (B est un cation quelconque) :



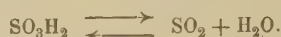
2. Dissociation chimique de l'anion aldéhydesulfureux :



3. Dissociation électrolytique de l'acide sulfureux libre :



4. Dissociation de l'acide sulfureux en anhydride sulfureux et eau :



W. Kerp n'a pas étudié l'influence de la concentration en ions H^+ sur la formation de l'acide aldéhydesulfureux, et il a fallu attendre les méthodiques travaux de Jaulmes et Espezzel pour avoir des indications précises à ce sujet.

Certains auteurs (6) ont voulu voir dans l'acide aldéhydesulfureux du vin, de l'acide « paraldéhydesulfureux ». Cependant, la paraldéhyde n'ayant pas de fonction aldéhydique CHO , ne saurait donner lieu à une combinaison sulfitique ; c'est la grande fixité de l'acide aldéhydesulfureux en solution acide qui a pu faire croire à une polymérisation.

Nous avons étudié en fonction de la concentration en ions H^+ dans le tableau suivant, la marche de la distillation de l'éthanal en combinaison avec SO_2 dans une solution contenant 221 mg. d'éthanal par litre.

TABLEAU I. — Distillation de l'acide aldéhydesulfureux en fonction du pH. Teneurs en milligrammes d'éthanal, solution contenant 221 mg. d'éthanal par litre.

pH	VOLUME DISTILLÉ		
	1/10	1/5	1/2
1,0	206	218	221
2,7	109	181	221
3,4	93	171	208
4,5	84	122	191
7,0	144	193	214
9,0	219	221	221

(6) L. MOREAU et E. VINET, *Ann. Falsif. Fraudes*, 1933, 26, 454.

La séparation de l'éthanal combiné à l'acide sulfureux est parfaite aux pH très bas et en milieu légèrement alcalin. Elle est moins bonne aux pH intermédiaires. En distillant la moitié du liquide au pH du vin, on obtient un déficit de 6 p. 100 et à la neutralité un déficit de 3 p. 100 environ. Dans les milieux contenant de l'acide sulfureux, le dosage de l'éthanal devra donc être conduit soit à pH 1,0 par acidification avec de l'acide sulfurique ou de l'acide phosphorique, soit encore à pH 8,5 ; il ne suffit pas dans ce cas de neutraliser le vin, on devra le tamponner par addition d'une solution de borate de sodium de pH 8,5.

La recommandation que l'on donne habituellement d'acidifier fortement le vin pour doser tout l'éthanal, paraîtrait assez justifiée par les résultats du tableau. Cependant, nous montrerons qu'il y a dans ces conditions formation directe d'aldéhydes ; un seul procédé donne des résultats constants et parfaitement définis : la distillation à pH 8,5 qui permet d'obtenir la somme éthanal libre plus éthanal à l'état de combinaison sulfite.

Combinaisons d'addition avec les polyphénols. — La propriété qu'ont les aldéhydes de former des combinaisons avec les polyphénols du vin a été indiquée en premier lieu par Trillat en 1892 (7) ; cet auteur a pu décolorer complètement des vins rouges par traitement à chaud en présence d'un excès de formol. De même l'éthanal est capable de provoquer un précipité avec la matière colorante des vins rouges, comme l'observa Martinand en 1898. Cette précipitation est lente, même pour des doses assez importantes d'éthanal et la limpidité de certains vins résiste plusieurs semaines à une addition de 150 mg. d'éthanal par litre. La précipitation est retardée par les degrés alcooliques forts. La combinaison et l'insolubilisation obéissent à des facteurs opposés : la combinaison est favorisée par les températures élevées et les pH bas ; la précipitation est par contre plus rapide aux basses températures et aux pH élevés.

Lorsqu'on ajoute de l'éthanal à un vin, 250 mg. par exemple, on constate habituellement sa disparition à peu près complète en quelques jours ou en quelques semaines à une douce température, en flacons bouchés ; c'est cette désaldéhydification qu'a étudiée Laborde et qu'il attribuait à une « réductase ». En réalité, toute trace d'acide sulfureux libre ayant disparu, il y a généralement développement de levures ou de bactéries lactiques ; l'éthanal est réduit en alcool. Ce n'est pas un phénomène d'ordre diastasique ; la présence et l'activité des cellules de levures ou de bactéries sont indispensables à la diminution de l'éthanal ; dans des suspensions de levures en milieu infermentescible, cette désaldéhydification n'a pas lieu.

(7) A. TRILLAT, *Bull. Soc. Chim.*, 1892, 7, 468.

L'addition d'éthanal à un vin placé ensuite à l'étuve constitue ainsi un procédé très simple pour se rendre compte de son état de stérilité et de fermentescibilité. Si on observe de cette manière une désaldéhydification plus rapide avec les vins jeunes, comme l'indiquait Laborde, en fait rares sont les vins rouges vieux, qui, dans ces conditions, demeurent stériles quelques mois.

Mais dans un vin blanc ou rouge, stérilisé par chauffage, filtration serrée ou addition d'un antiseptique (autre que SO_2 bien entendu), il est possible encore de saisir par l'analyse une combinaison très lente et progressive de l'éthanal, une désaldéhydification chimique. Ces combinaisons de l'éthanal avec les polyphénols sont stables à pH 8,5, alors qu'elles sont détruites en milieu très acide et la différence entre deux distillations conduites à ces pH donne assez bien une indication de l'éthanal ainsi combiné.

Le tableau 2 suit la combinaison de l'éthanal dans deux vins blancs et deux vins rouges, additionnés de 300 mg. environ d'éthanal, puis pasteurisés à 80°, et conservés ensuite à la température de 25° en bouteilles bouchées de liège.

TABLEAU II. — Combinaison progressive de l'éthanal avec les polyphénols dans les vins stérilisés. Teneurs en milligrammes d'éthanal par litre.

		APRÈS 8 jours	APRÈS 2 mois	APRÈS 5 mois	APRÈS 1 an
Vin blanc, n° 1.	Ethanal libre (pH 8,5) . .	482	426	393	351
	Ethanal total (pH 2,0) . .	521	532	529	530
	Ethanal combiné . . .	39	106	136	179
Vin blanc, n° 2.	Ethanal libre . . .	417	374	351	305
	Ethanal total . . .	447	449	451	452
	Ethanal combiné . . .	30	75	100	147
Vin rouge, n° 1.	Ethanal libre . . .	324	276	254	218
	Ethanal total . . .	348	334	322	313
	Ethanal disparu . . .	24	72	94	130
Vin rouge, n° 2.	Ethanal libre . . .	315	256	227	188
	Ethanal total . . .	338	310	290	264
	Ethanal disparu . . .	23	59	88	127

L'éthanal combiné est la différence entre l'éthanal total et l'éthanal libre; l'éthanal disparu, la différence entre l'éthanal libre et la dose initiale d'éthanal total.

Il y a eu dans tous les cas disparition lente et continue d'éthanal libre, qui se retrouve dans le dosage de l'éthanal combiné; après un an, un tiers environ de l'éthanal est engagé dans les combinaisons avec les polyphénols. Cependant, l'éthanal « total »

obtenu par distillation acide, a baissé dans les vins rouges ; sans doute parce qu'il y a eu précipitation de 50 p. 100 de la couleur, mais aussi parce que les combinaisons solubles de l'éthanal deviennent avec le temps de plus en plus difficilement hydrolysables par acidification et échappent au dosage ; elles se polymérisent. Ceci s'observe aussi avec les vins blancs ; voici une expérience qui le montre : un vin blanc est conservé en flacons bouchés, en présence d'éthanal libre (470 mg. au départ). On lui applique l'hydrolyse acide avec différentes proportions d'acide phosphorique, après la première année et après huit ans de conservation ; il est demeuré limpide. Voici les quantités d'éthanal recueillies en distillant la moitié du volume.

	TÉMOIN sans éthanal	ADDITIONNÉ D'ÉTHANAL	
		Après 1 an	Après 8 ans
Ethanal libre (distillé à pH 8,5)	32	335	251
Ethanal total (distillé avec 4 p. 100 d'acide phosphorique)	35	445	328
Ethanal total (distillé avec 10 p. 100 d'acide phosphorique)			369
Ethanal total (distillé avec 20 p. 100 d'acide phosphorique)	47	472	413

Dans le vin témoin, l'hydrolyse avec 20 p. 100 d'acide phosphorique a libéré 12 mg. d'éthanal de plus que l'hydrolyse avec 4 p. 100 du même acide ; dans le vin additionné d'éthanal, la différence entre les deux hydrolyses atteint 25 mg. après un an et 85 mg. après huit mois, preuve que dans ce dernier cas l'éthanal est engagé dans des combinaisons difficilement hydrolysables.

De la même façon, le précipité obtenu dans un vin rouge par addition d'éthanal, cède peu d'éthanal par hydrolyse acide, surtout s'il est vieux ; comme l'indique Laborde, il est nécessaire de pousser la distillation et de la reprendre par une nouvelle addition d'eau et d'acide. L'addition de 4 à 5 p. 100 d'acide phosphorique ne serait donc pas toujours suffisante pour séparer tout l'éthanal combiné.

Quelle peut être l'importance de cette combinaison de l'éthanal avec les polyphénols dans les conditions normales de conservation des vins ? Certainement très faible, les vins normaux ne pouvant avoir que tout à fait momentanément de l'éthanal libre et il est difficile d'envisager avec Trillat et Martinand, la combinaison avec l'éthanal comme la cause habituelle de la précipitation du colorant dans les vins rouges en fûts ou en bouteilles, ou à la

suite d'une altération. L'identité d'aspect microscopique des précipités ne saurait être ici une preuve décisive, comme l'estimait Trillat; si l'aspect microscopique est caractéristique d'une substance colloïdale, il ne l'est pas forcément de l'agent de précipitation de cette substance.

Réactions étrangères dans la distillation en milieu acide. — Il est aisé de se rendre compte que la distillation du vin en milieu acide ne permet pas d'obtenir un chiffre stable et bien défini. Suivant que l'acidification est plus ou moins forte, la fraction distillée plus ou moins volumineuse, on obtient des résultats plus ou moins élevés; il n'y a pratiquement pas de limite à la production d'aldéhyde dans une distillation en milieu acidifié: le tableau suivant donne l'illustration de ce fait.

TABLEAU III. — Formation d'éthanal par hydrolyse acide des vins. Teneurs en milligrammes par litre.

	DISTILLÉ à pH 8,5	DISTILLÉ à pH 3,0	DISTILLÉ A pH 1 5 p. 100 PO ₂ H ₂	
	1/2 du volume	1/2 du volume	1/2	9/10
Vin blanc, n° 1.	49	51	57	97
Vin blanc, n° 2.	43	48	72	110
Vin blanc, n° 3.	70	72	77	88
Vin rouge, n° 1.	12	12	20	32
Vin rouge, n° 2.	24	31	36	54
Vin rouge, n° 3.	44	51	60	105
Vin rouge, n° 4.	32	34	41	56

Il se forme notamment une proportion importante de furfurol en milieu acide à partir des pentoses du vin; la formation de furfurol, suivie par la réaction à l'aniline, est déjà nette au pH du vin; elle est toujours nulle à pH 8,5. Rappelons que le furfurol, présent dans les eaux-de-vie à l'état de traces, n'existe jamais préformé dans le vin, mais il prend naissance au cours de la distillation aux pH bas, aux dépens des pentoses, comme l'ont montré Pasquero, Cavagneri et Haid, en 1912; la même démonstration avait été donnée également pour la bière à la fin du siècle dernier.

Lorsqu'on poursuit la distillation à volume constant, on continue à séparer des proportions de furfurol de plus en plus importantes, mais encore d'autres aldéhydes et notamment de l'éthanal et du formol provenant des hexoses. En définitive, il n'est pas possible, comme il avait été toujours indiqué jusqu'ici, d'obtenir un chiffre constant dans une distillation acide et la notion d'aldéhyde totale du vin ne signifie rien. Un seul chiffre a une valeur: c'est

celui qui est obtenu dans une distillation à pH 8,5 et qui représente la somme éthanal libre plus acide aldéhydesulfureux.

Mode opératoire du dosage de l'éthanal dans les vins et autres milieux fermentés. — Une prise de 25 cm³ de vin placée dans un ballon de 300 cm³ est neutralisée en présence de phénolphtaléine par la quantité de soude normale nécessaire. On ajoute 25 cm³ d'un tampon boraté de pH 8,5-9,0 (de composition suivante : borate de sodium, 25 g. ; acide sulfurique N, 25 cm³ ; compléter à un litre). On distille lentement et recueille dans un ballon jaugé de 50 cm³, contenant 20 cm³ de la solution de pH 7 et 5 cm³ de la solution de bisulfite. Le tube d'arrivée du distillat doit plonger dans la solution tampon ; on arrête la distillation lorsque le distillat affleure le trait de jauge. On mélange et on titre suivant les indications déjà données.

IV. — L'ACIDE SULFUREUX DANS SES RAPPORTS AVEC L'ÉTHANAL DES VINS. — DOCUMENTS ANALYTIQUES.

L'acide sulfureux du moût et du vin, en bloquant l'éthanal au fur et à mesure de sa formation dans une combinaison remarquablement stable, est lui-même fixé sous une forme définitive. Uni à l'éthanal, il échappe désormais à l'oxydation et est pratiquement sans aucune action antiseptique ni antioxygène ; il ne joue aucun rôle dans la conservation du vin. Laborde, commentant les observations antérieures de Martinand et de Passerini, insistait en 1917 sur le fait que la fermentation en présence d'acide sulfureux, et surtout les refermentations ralenties par des additions trop faibles et répétées d'acide sulfureux, conduisent à des fixations d'éthanal beaucoup plus élevées et aboutissent par voie de conséquence à des vins ayant des teneurs en acide sulfureux total pouvant dépasser la limite tolérée. Ce sont presque toujours les vins qui ont les plus fortes teneurs en éthanal, qui possèdent également le plus d'acide sulfureux total.

La vitesse et la limite de la combinaison de l'acide sulfureux dans les vins à la suite d'additions, dont la connaissance est dans la pratique d'application quotidienne, et la vitesse de dissociation de l'acide sulfureux combiné au fur et à mesure que la partie libre disparaît, ont été étudiées par Moreau et Vinet dans plusieurs travaux (8). D'après ces auteurs, l'acide sulfureux peut se trouver à l'état combiné avec les éléments fixes du vin et avec les éléments volatils. La libération progressive du SO₂ combiné s'opère en deux phases distinctes ; la première, relativement rapide, correspond aux combinaisons avec les éléments non volatils, combinaisons peu stables ; la seconde phase, très lente, cor-

(8) L. MOREAU et VINET, *Ann. Falsif. Fraudes*, 1927, 20, 316 ; 1928, 24, 130 et 1933, 26, 454.

respond aux combinaisons très stables de l'acide sulfureux avec les éléments volatils du vin.

Dans ces études, les auteurs ne préjugent aucunement de la nature chimique de ces éléments. Cependant, on peut admettre que les éléments volatils de Moreau et Vinet sont représentés, en première approximation, par l'éthanal, et les éléments fixes par les sucres de vin. Il peut bien exister encore dans les vins, mais à des concentrations très faibles, certains corps à fonction cétonique combinant de l'acide sulfureux, comme l'acide pyruvique, comme l'acétylméthylcarbinol (généralement moins de 10 mg. par litre).

On connaît certaines constantes physico-chimiques des combinaisons de l'acide sulfureux, notamment dans quelles proportions elles régénèrent l'acide sulfureux libre en solution aqueuse. Voici, d'après Kerp, pour diverses combinaisons de l'acide sulfureux, le pourcentage de la fraction libre en équilibre avec la fraction combinée, dans une solution 1/30 moléculaire, indications qui permettent de comparer leur stabilité.

	POURCENTAGE d'acide sulfureux libéré dans une solution 1/30 moléculaire
Acide formaldéhydesulfureux.	0,15
Acide acétaldéhydesulfureux	0,71
Acide acétonesulfureux.	23,6
Acide arabinosesulfureux.	61,6
Acide glucosesulfureux	87,2

La combinaison avec le formol est la plus stable, cinq fois plus environ que la combinaison avec l'éthanal. Par contre, l'hydrolyse de l'acide glucosesulfureux est cent fois plus grande que celle de l'acide aldéhydesulfureux.

On n'avait pas encore envisagé de déterminer directement dans un vin les teneurs des diverses combinaisons de l'acide sulfureux : acide aldéhydesulfureux et acide sulfureux combinés à d'autres substances. Les proportions de ces combinaisons sont cependant très faciles à calculer, sans avoir recours à l'établissement des graphiques de dissociation de Moreau et Vinet. Il suffit de connaître les teneurs de l'acide sulfureux libre, de l'acide sulfureux total et de l'éthanal, sachant que 44 mg. d'éthanal se combine à 64 mg. de SO_2 . Les tableaux 4 et 5 représentent les états de SO_2 ainsi calculés, dans un certain nombre de vins de Bordeaux, blancs et rouges.

SO_2 combiné à l'éthanal est pratiquement fixe et indépendant de SO_2 libre et de la température ; SO_2 combiné aux autres substances, qui peut être parfois beaucoup plus faible, mais parfois aussi important ou beaucoup plus important que l'acide

aldéhydesulfureux, est en équilibre avec SO_2 libre et dépend de la température (9). C'est cette partie de l'acide sulfureux combiné qui se dissocie presque immédiatement lorsque la température du vin augmente ou que l'acide sulfureux libre diminue.

V. — ACÉTAL. — RÉACTION D'ACÉTALISATION (10).

L'acétal se forme nécessairement toutes les fois qu'il y a de l'éthanal en présence d'alcool. On sait que l'acétal résulte de la

TABLEAU IV. — Teneurs en éthanal et états de SO_2 dans les vins blancs de Bordeaux. Teneurs en milligrammes par litre.

	ANNÉE	SO_2 libre	SO_2 total	SO_2 combiné	ÉTHANAL	SO_2 combiné à l'éthanal	SO_2 combiné à d'autres substances
Sauternes	1914	22	244	222	109	160	62
Sauternes	1914	24	252	228	75	109	119
Sauternes	1918	24	292	268	96	140	128
Sauternes	1929	32	272	240	69	100	140
Haut-Barsac	1929	68	368	300	117	170	130
Preignac	1931	20	208	188	72	104	84
Barsac	1933	48	248	200	46	67	133
Barsac	1933	68	404	336	123	179	157
Barsac	1933	54	400	346	134	195	151
Sainte-Croix-du-Mont .	1936	24	136	112	35	51	61
Sauternes	1936	44	184	140	35	51	89
Graves	1936	48	164	116	33	48	68
Barsac	1936	16	264	248	114	166	82
Haut-Barsac	1936	96	364	268	65	95	173
Sauternes	1936	82	316	434	222	322	112
Sainte-Croix-du-Mont .	1937	48	296	248	118	172	76
Sauternes	1937	108	376	268	54	79	189
Entre-deux-mers . . .	1937	10	292	282	165	240	42
Entre-deux-Mers . . .	1937	80	416	336	140	204	132
Haut-Sauternes	1937	42	236	194	73	106	88
Haut-Sauternes	1937	62	240	178	43	63	115
Entre-deux-Mers . . .	1938	104	200	96	19	28	68
Barsac	1938	116	328	212	54	79	133
Haut-Barsac	1938	20	144	124	55	80	44
Haut-Sauternes	1938	96	336	240	64	93	147
Haut-Sauternes	1938	12	228	216	103	150	66
Graves	1938	68	272	204	43	63	141

combinaison, avec formation d'eau, de deux molécules d'alcool et d'une molécule d'éthanal suivant l'équation :



(9) J. RIBÉREAU-GAYON, *Ann. Falsif. Fraudes*, 1932, 25, 339.

(10) E. PEYNAUD et A. MAURIÉ, *Bull. intern. Vin*, 1938, 118, 142.

TABLEAU V. — Teneurs en éthanal et états de SO_2 dans les vins rouges de Bordeaux. Teneurs en milligrammes par litre.

	ANNÉE	SO_2 libre	SO_2 total	SO_2 combiné	ETHANAL	SO_2 combiné à l'éthanal	SO_2 combiné à d'autres substances
Médoc	1929	0	58	58	29	42	16
Saint-Émilion	1934	0	51	51	25	36	15
Graves	1936	10	201	191	83	120	71
Médoc	1936	0	56	56	24	35	1
Médoc	1936	0	64	64	42	61	3
Pomerol	1936	0	56	56	35	52	4
Médoc	1936	0	28	28	18	26	2
Saint-Émilion	1937	10	63	53	26	38	15
Saint-Émilion	1937	10	69	59	31	45	14
Saint-Émilion	1937	0	36	36	21	30	6
Saint-Émilion	1937	0	56	56	32	47	9
Haut-Médoc	1937	26	110	84	32	47	37
Blayais	1938	3	32	29	18	26	3
Blayais	1938	6	22	16	14	20	2
Blayais	1938	0	20	20	11	16	4
Blayais	1938	0	19	19	13	19	0
Blayais	1938	3	20	17	11	16	1

L'acétalisation étant une réaction limitée, il était intéressant de rechercher pour quelles quantités d'acétal est satisfait l'équilibre de la réaction suivant le titre alcoolique, si cet état d'équilibre est bien atteint au cours du vieillissement dans les boissons alcooliques, et avec quelle vitesse se poursuit ce phénomène.

a) *Dosage de l'acétal.* — A pH 9, l'acétal en solution diluée distille avec le premier dixième du volume sans aucune décomposition, sans aucune formation non plus si la réaction est inachevée. D'autre part, ce corps est complètement décomposé en régénérant l'éthanal, dans une distillation conduite vers pH 2. C'est ce qu'établissent les résultats ci-dessous, relatifs à la distillation à divers pH, d'une solution contenant 630 mg. d'acétal par litre :

	ACÉTAL hydrolysé en milligrammes
pH 1 environ	630
2.	630
3.	602
4.	584
7.	14
7,6.	8
8.	5
9.	0

Le mode opératoire du dosage de l'acétal en présence d'éthanal sera donc le suivant :

Une première distillation de la moitié du volume est effectuée sur le liquide neutralisé et ajusté à pH 9. Ceci ayant pour but de séparer dans une solution beaucoup plus simple que le milieu initial, l'éthanal et ses combinaisons volatiles. Ce distillat est partagé en deux volumes égaux, qui sont à nouveau distillés, l'un à pH 9 pour obtenir l'éthanal libre, l'autre en milieu très acide (1 p. 100 en volume d'acide phosphorique sirupeux) pour obtenir la somme éthanal plus acétal.

Cette méthode nous a servi à l'étude de la statique et de la cinétique de la réaction d'acétalisation dans la conservation des eaux-de-vie.

Nous avons repris, on le voit, la méthode imaginée par Trillat. Mais cet auteur appliquait la distillation acide directement au vin ou à l'eau-de-vie, et on comprend bien maintenant pourquoi les chiffres qu'il obtenait étaient excédentaires.

b) *Limite de la réaction d'acétalisation.* — Des solutions alcooliques de titres croissants, légèrement acides, reçoivent 500 mg. environ d'éthanal par litre. Elles sont laissées en repos quelques jours à la température de 15°, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint, ce qui est contrôlé.

L'état d'équilibre du système obtenu à ce moment, est régi en première approximation par les concentrations respectives des constituants. La loi peut se formuler ainsi :

$$K = \frac{ac \times H_2O}{al \times ol}$$

où *ac*, *al* et *ol* désignent respectivement les concentrations moléculaires de l'acétal, de l'éthanal libre et de l'alcool. *K* est la constante d'équilibre ; sa valeur a été calculée et est reproduite dans la dernière colonne du tableau. (L'alcool employé à la préparation des solutions contenait lui-même un peu d'éthanal, ce qui donne des teneurs en aldéhyde totale croissantes dans le même sens que le degré alcoolique.)

Nous obtenons pour *K* des chiffres identiques, à quelques p. 100 près. Sa valeur moyenne est 0,86. Elle permet de calculer, par application de la formule indiquée, la teneur limite en acétal qu'une solution alcoolique, dont on connaît le titre, peut posséder.

Contrairement à ce qui se passe pour les réactions d'estérification par exemple, pour lesquelles la constante est à peu près indépendante de la température, l'équilibre des réactions d'acétalisation subit son influence. Toutes choses égales, à la limite, il y a davantage d'acétal quand la température est plus faible.

Voici les valeurs de K mesurées à diverses températures pour le système éthanal-éthanol :

TEMPÉRATURE	K
3° C	1,01
15° C	0,86
24° C	0,77
37° C	0,66

TABLEAU. VI. — Équilibre de la réaction d'acétalisation en fonction du titre alcoolique. Température : 15° C. Les teneurs en éthanal sont des milligrammes par litre. Le pourcentage d'éthanal acétalisé est calculé sur l'éthanal total.

TITRES alcooliques en degrés	ETHANAL total	ETHANAL combiné à l'alcool	POURCENTAGE d'éthanal combiné à l'alcool	K
10			3,0 (1)	
20	493	32	6,5	0,88
30	506	51	10,1	0,84
40	518	79	15,2	0,86
50	529	114	21,5	0,88
60	554	163	29,4	0,89
70	567	223	39,3	0,88
80	575	290	50,4	0,82

(1) Ce chiffre a été obtenu par extrapolation en adoptant K = 0,86. La teneur en acétal était trop faible pour permettre un dosage direct.

c) *Vitesse de la réaction d'acétalisation.* — On savait depuis longtemps que la combinaison des alcools et des aldéhydes est singulièrement accélérée par la présence d'acides ; à ce titre, les acides minéraux se montrent plus actifs que les acides organiques ; aujourd'hui, nous disons que l'acétalisation est catalysée par les ions H^+ .

La vitesse de la réaction a été étudiée en fonction du pH pour une solution contenant 40 p. 100 d'alcool en volume. Voici les délais très approximatifs, la solution contenant un peu d'acétal au départ, au bout desquels on arrive à la position d'équilibre à la température de 18° :

pH 2	4 heures.
3	16 heures.
4	3 jours.
5	3 mois.

Le titre alcoolique fait varier assez peu ces temps. L'aldéhydification du vin, milieu de pH 3 environ, par oxydation violente ou sous un voile de *M. vini* par exemple, sera donc suivie de près par l'acétalisation, mais la fraction acétalisée est infime.

d) *Teneurs en acétal de quelques vins et spiritueux.* — Les vins sains, dans les conditions normales de conservation, ne possèdent pas la moindre trace d'acétal ; certains vins, qui tirent leurs caractères d'une oxydation profonde, peuvent en contenir des traces à peine dosables. Nous avons appliqué à quelques vins la méthode indiquée pour le dosage de l'acétal, par hydrolyse acide du distillat, et établi le tableau ci-dessous :

TABLEAU VII. — Les vins contiennent-ils de l'acétal ?
Teneurs en milligrammes par litre.

NATURE DU VIN	ÉTHANAL libre du distillat	ÉTHANAL total du distillat	ACÉTAL
Vin blanc, 1936.	41	40	Néant.
Graves, 1934	43	13	Néant.
Vin blanc.	195	194	Néant.
Vin rouge, 1934.	37	36	Néant.
Vin rouge fleuri, n° 1.	101	101	Néant.
Vin rouge fleuri, n° 2.	195	195	Néant.
Bourgogne 1893, très oxydé. . .	20	20	Néant.
Vin blanc madérisé, n° 1. . . .	45	44	Néant.
Vin blanc madérisé, n° 2. . . .	21	22	Traces.
Vin blanc madérisé, n° 3. . . .	81	82	Traces.
Porto rouge, n° 1.	65	68	3
Porto rouge, n° 2.	39	40	Traces.

A priori il est difficile de se faire une idée exacte de la vitesse d'acétalisation dans les eaux-de-vie. Leur acidité réelle est très faible, difficilement mesurable à cause de la grande concentration en alcool. Seuls peuvent renseigner des résultats obtenus directement sur ces liquides. Nous avons dosé l'éthanal libre et acétalisé dans une vingtaine d'eaux-de-vie de Cognac (Fine Champagne) de la récolte de 1937 quelques mois après leur distillation ; nous indiquons dans le tableau VIII les doses extrêmes et moyennes qu'elles présentent ; y figurent encore les résultats obtenus pour des eaux-de-vie beaucoup plus anciennes. L'examen comparatif des deux dernières colonnes indique où en est l'acétalisation.

Nous avons encore trouvé dans une eau-de-vie de marc de Bourgogne, 78 mg. d'acétal, et dans un rhum de la Martinique, 35 mg., la limite d'acétalisation étant pratiquement atteinte.

D'après les résultats du tableau, on pourrait avancer que la limite est sensiblement approchée en une dizaine d'années. Mais il ne serait pas exact de considérer, comme on le suppose dans ces calculs, que la dose d'éthanal et le titre alcoolique demeurent constants au cours du vieillissement.

L'éthanal des eaux-de-vie a deux origines. Elle préexiste dans

TABLEAU VIII. — Teneurs en acétal
des eaux-de-vie des Charentes (Fine Champagne).
Teneurs en milligrammes par litre

	TITRE alcoolique en degrés	ÉTHANAL total en milligrammes	ÉTHANAL combiné à l'alcool	ACÉTAL	POURCENTAGE d'éthanal combiné à l'alcool	
					actuel	à la limite
1937 {	Teneurs extrêmes.	55	9	24	43	40 environ.
	70	à	à	à	à	
	Teneurs moyennes.	156	44	118	31	
		72	20	54	23	
1936	71	107	35	94	33	40
1934	69	103	31	83	30	38
1930	63	86	24	64	28	32
1904	46	185	34	86	48	19
1860	52	140	34	94	24	23

le vin, dans lequel elle prend naissance au cours de la fermentation ou à la faveur d'une aération ; cette quantité est minime, d'autant que les produits de tête, riches en aldéhydes sont éliminés. La principale source d'éthanal et par conséquent d'acétal, se trouve dans l'oxydation lente de l'alcool pendant la garde sous bois. Cette aldéhydification est progressive. Mais l'éthanal s'oxyde aussi en acide acétique, et on voit le milieu s'acidifier au cours des années ; de ce fait, les vitesses de réaction s'accroissent. D'autre part l'éthanal peut s'évaporer. Ces variations viennent rompre l'équilibre de l'acétalisation.

D'un autre côté, la teneur en acétal d'une eau-de-vie fraîchement distillée n'est pas absolument nulle. Un vin dont la fermentation était juste achevée, additionné d'éthanal pour rendre le phénomène plus apparent, est distillé au laboratoire suivant les règles de la préparation des eaux-de-vie. L'alcool obtenu titre 57° et contient 242 mg. d'éthanal par litre, dont 19, soit une proportion de 7,8 p. 100, sont acétalisés. Un tiers de la réaction est donc déjà accompli au cours de la distillation.

On a admis que les acétals, en particulier ceux des aldéhydes et alcools supérieurs, pouvaient être des facteurs du bouquet des eaux-de-vie. Ces corps ne se forment pas seulement entre aldéhyde et alcool correspondants, il existe des acétals éthanal-propanol et butanal-éthanol, par exemple. Toutefois les teneurs en acétals supérieurs ne peuvent être que très faibles, par rapport à celles de l'acétal éthylique; elles ne sauraient atteindre que quelques fractions de mg. par litre d'eau-de-vie, concentration suffisante, il est vrai, pour avoir quelque effet organoleptique. A l'état pur

ou en dilution, l'acétal éthylique, le plus important dans les eaux-de-vie, dégage une odeur résineuse. Toutefois, lorsqu'on connaît les conditions de formation des acétals, on n'hésite pas à exclure ces corps de la liste des constituants du bouquet des vins normaux.

Il est tentant d'établir un parallèle entre les processus de l'acétalisation et de l'estérification chimique de l'alcool des spiritueux, étudiée par Peynaud (11). Ces deux réactions limitées présentent en effet quelque analogie. Les constantes d'équilibre montrent que pour des doses équivalentes d'acide et d'éthanal, on rencontrerait dans une solution où ces deux réactions sont achevées environ quatre parties d'alcool combinées aux acides pour une seule combinée à l'éthanal. Mais ces deux réactions se distinguent surtout par leurs rapidités respectives. Si la limite de formation est atteinte pour l'acétal en quelques années dans les eaux-de-vie, elle n'est jamais approchée pour les esters. La vitesse de l'acétalisation dans une solution de pH 3 comme le vin, est plusieurs milliers de fois plus grande que celle de l'estérification.

e) *Hydrolyse de l'acétal.* — Une expérience de Trillat établissait, dans l'esprit de cet auteur, que l'acétal donne une combinaison insoluble avec la matière colorante des vins rouges, au même titre que l'éthanal. L'extrait des vins additionné de quelques grammes d'éthanal, subirait une augmentation de poids qui correspondrait à la proportion de ce corps « combiné » au colorant.

En réalité, Trillat aurait pu observer qu'il y avait hydrolyse complète, extrêmement rapide, de l'acétal ajouté au vin, et que l'expérience revenait tout simplement à additionner le vin d'éthanal. L'acétal présente en effet à la température ordinaire, pour des pH voisins de ceux des vins, une grande facilité de dédoublement ; c'est une substance peu stable en milieu acide. La réaction d'hydrolyse catalysée par les ions H^+ , se poursuit suivant la loi des réactions monomoléculaires avec une vitesse directement proportionnelle à la concentration en ions H^+ du milieu, tout au moins lorsqu'on se trouve entre certaines limites de concentration en acétal, et lorsque la concentration des autres ions n'intervient pas. Elle a pu être utilisée par l'un de nous à la mesure du pH des vins (12). On peut considérer en effet la concentration totale des ions neutres comme peu variable d'un vin à un autre.

Les courts délais suffisants à l'hydrolyse à la température ordinaire, la facilité du dosage de l'éthanal libéré, donnent à la méthode chimique à l'acétal pour la mesure du pH, beaucoup d'avantages pratiques sur les méthodes qui suivent l'inversion du saccharose par exemple. Ainsi l'hydrolyse de l'acétal à la tempé-

(11) E. PEYNAUD, *Rev. de Vitic.*, 1937, **86**, 209.

(12) E. PEYNAUD, *Ann. Falsif. Fraudes*, 1937, **30**, 390.

rature de 25° est, à pH égal, environ 40 fois plus rapide que l'hydrolyse du saccharose à 35°.

Nous donnons dans le tableau 9 les constantes de vitesse d'hydrolyse suivant le pH, mesurées à 25°. Il est aisé de voir qu'il y a bonne proportionnalité entre la constante et la concentration en ions H^+ ; l'erreur ne dépasse pas 2,5 p. 100.

TABLEAU IX. — Constantes de la vitesse d'hydrolyse de l'acetal a divers pH. Température : 25° C.

pH	CONCENTRATIONS en ions H^+	VALEURS de C
2,40	$0,400 \times 10^{-2}$	0,179
2,60	$0,251 \times 10^{-2}$	0,1104
2,80	$0,159 \times 10^{-2}$	0,0740
3,00	$0,100 \times 10^{-2}$	0,0460
3,20	$0,630 \times 10^{-3}$	0,0299
3,40	$0,400 \times 10^{-3}$	0,0180
3,60	$0,251 \times 10^{-3}$	0,0117
3,80	$0,159 \times 10^{-3}$	0,00738
4,00	$0,100 \times 10^{-3}$	0,00451
4,20	$0,630 \times 10^{-4}$	0,00290

On trouve dans les tables de Landolt les valeurs de C, déterminées en 1929 par Bronsted et Wynne Jones, aux Etats-Unis, dans des solutions millinormales d'acide chlorhydrique et dans des solutions tampons acide formique-formiate, de pH voisin de 3,0 ; elles sont du même ordre de grandeur que celles que nous indiquons ici.

RECHERCHES SUR LE RUBIDIUM CHEZ LES CRYPTOGAMES (1)

par GABRIEL BERTRAND et DIDIER BERTRAND.

Nous avons communiqué, dans un mémoire récent (2), les résultats des nouvelles recherches quantitatives sur le rubidium que nous avons faites chez les plantes phanérogames. Nous apportons aujourd'hui ceux que nous avons obtenus en étendant cette étude aux plantes cryptogames.

Jusqu'à présent nous n'avions examiné qu'une Fougère, 2 Algues marines et 8 Champignons. D'après ce petit nombre d'espèces, la teneur moyenne en rubidium des Cryptogames avait paru supérieure à celle des Phanérogames. En vue d'élucider ce qu'il pouvait y avoir de réel dans cette indication, nous avons opéré depuis sur 81 espèces, dont 3 Algues marines et 1 d'eau douce, 1 Bactériacée, 61 Champignons basidiomycètes et ascomycètes, 3 Lichens, 2 Mousses, 8 Fougères, 1 Prêle et 1 Lycopode, toutes espèces récoltées dans les habitats les plus divers.

Le Fucus et la Laminare nous ont été envoyés à l'état frais de Roscoff ; le premier a été soumis dès son arrivée au laboratoire, à un rapide lavage avec une solution de chlorure de sodium pur, isotonique à l'eau de mer, puis à l'eau distillée ; la Laminare, plus sensible à la plasmolyse, a été simplement égouttée, avant d'être séchée pour l'analyse ; le Carragahen appartenait depuis longtemps à la collection du laboratoire. L'Algue verte filamenteuse, déterminée par M. Roger Heim comme *Cladophora*, provenait d'un bassin du Muséum d'Histoire naturelle, dans lequel elle croissait avec *Elodea canadensis*, utilisée dans le Mémoire précédent et dont on l'avait séparée brin par brin. La Bactériacée, *Bacillus megatherium*, avait été obligeamment cultivé par M. Maurice Lemoigne, sur du bouillon de haricot, sucré, peptoné et rendu solide par de la gélose ; nous l'avions séparé avec soin de son support.

D'autre part, nous avons récolté *Usnea barbata* sur des Mélèzes, à Chamonix, le Lichen des Rennes sur un rocher et la Sphaigne dans une tourbière, en Norvège, *Pamelia caperata*, la Mousse ordinaire, provenait de la forêt de Fontainebleau, *Polystichum spinulosum*

(1) Un extrait de ce mémoire a été publié dans les *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 572.

(2) Ces *Annales*, 1947, **73**, 472.

d'un endroit ordinairement humide du bois de Meudon, le Côtérach et l'*Asplenium trichomanes* croissaient entre les briques d'un mur de Vendée, le Polypode et la Capillaire noire sur les talus élevés au bord des routes à Martinet, dans la même région que les deux Fougères précédentes ; la Scolopendre, le Blechnum et le Lycopode avaient été aimablement récoltés dans les Pyrénées par MM. Goris et Bouget. Enfin, nous avons trouvé *Adiantum capillus veneris* entre les pierres calcaires d'un gros mur exposé à l'humidité, dans le Lot-et-Garonne.

Quant aux Champignons, la moitié environ provenait de nos propres cueillettes, les autres des récoltes que de bienveillants mycologues, en particulier MM. Roger Heim, Maublanc, Joachim, André, avaient mis à notre disposition. L'ergot de seigle nous avait été fourni par une maison de commerce pharmaceutique. En ce qui concerne les champignons frais, il n'est pas inutile de signaler que seuls les exemplaires en bon état ont été soumis aux analyses ; ceux qui étaient atteints par des larves en quelque endroit, pied ou chapeau, ont été entièrement rejetés (3).

L'examen des résultats rassemblés dans le tableau ci-dessus montre, tout d'abord, que le rubidium a été retrouvé et dosé dans tous les cas. Et, si l'on porte quelque attention à cet examen, on aperçoit, en outre, que la répartition quantitative de ce métal, très variable avec les espèces, présente une dépendance marquée avec certains groupes définis par la Systématique.

La constatation de la présence du rubidium sans aucune exception dans les 81 espèces de Cryptogames que nous envisageons aujourd'hui, s'ajoutant à celle que nous avons faite antérieurement sur 11 Cryptogames et sur 105 Phanérogames (4), soit au total sur environ 200 espèces végétales, apporte un argument définitif en faveur de l'existence aussi générale du rubidium que de celle du potassium et du sodium (5) dans l'organisme des représentants du monde végétal.

Le mode de répartition quantitative du rubidium parmi les espèces, mérite aussi de retenir l'attention. Les nouvelles données que nous apportons confirment largement la notion seulement entrevue et rappelée au commencement de ce mémoire, relative à la différence remarquable de teneur en rubidium des Phanérogames et des Cryptogames. Tandis qu'il n'a été trouvé chez les premières que de 1 à 98 mg. de rubidium par kilogramme de

(3) Pour la méthode d'analyse se reporter au mémoire de ces *Annales*, 1946, **72**, 416.

(4) C. R. Acad. Sci., 1944, **219**, 325 et Erratum, *ibid.*, 632 ; *loc. cit.* en (1).

(5) Gabriel BERTRAND et PERIETZEAU, *Bull. Soc. Chim.*, 1927, **41**, 709 ; Gabriel BERTRAND et M^{me} ROSENBLATT, *Bull. Soc. Chim.*, 1928, **43**, 368 et 1133 ; *ibid.*, 1930, **47**, 639.

NOM DES PLANTES	MATIÈRE SÈCHE p. 100	CENDRES p. 100 de matière sèche	K en grammes de matière sèche	Na par kilogramme de matière sèche	RUBIDIUM en milligrammes par kilogramme de matière sèche
<i>Lycopodiacees :</i>					
Lycopode (<i>Lycopodium clavatum</i> L.)		4,1	9,2	0,24	27,6
<i>Equisetacees :</i>					
Prêle (<i>Equisetum arvense</i> L.) . . .		19,9	26,5	0,27	55,6
<i>Fougères :</i>					
Herbe dorée (<i>Ceterach officin.</i> Willd.)		3,3	9,4	0,28	34,4
Régliasse des bois (<i>Polypodium vulg.</i> L.)		5,5	21,6	0,77	50,4
Fougère des bois (<i>Polystichum spinulos.</i> D. C.)	32,0	5,8	14,9	0,05	61,9
Capillaire noire (<i>Asplenium adiantum nigrum</i> L.)		6,4	17,7	0,70	20,3
Capillaire (<i>Asplen. trichomanes</i> L.)		4,6	6,9	0,39	29,1
Scolopendre (<i>Scolopendrium offic.</i> Smith) :					
Frondes stériles		10,0	24,4	0,53	81,9
Frondes fertiles		8,6	26,4	0,44	42,3
<i>Blechnum spicant</i> Roth :					
Frondes stériles		10,2	17,2	5,8	29,2
Frondes fertiles		11,8	18,4	1,6	29,1
Capillaire chevelure de Vénus (<i>Adiantum capillus veneris</i> L.)		19,5	34,9	0,40	81,0
<i>Mousses :</i>					
<i>Hypnum purum</i> L.		4,4	6,5	0,12	16,9
<i>Polytrichum commun.</i> L.		2,7	7,9	0,14	13,4
<i>Sphagnum papillorum</i> Linab		2,6	5,7	0,83	11,8
<i>Lichens :</i>					
Usnée (<i>Usnea barbata</i>)		1,4	3,0	0,04	7,5
<i>Parmelia caperata</i> Ach.		7,2	3,8	0,22	24,6
Lichen des Reines (<i>Cladonia rangiferina</i>)		0,9	0,9	0,9	2,4
<i>Algues :</i>					
Carragahen (<i>Chondrus crispus</i> Lyngb.)		26,0	23,1	33,2	29,0
Laminaire (<i>Laminaria digitata</i> Lm.)		27,9	33,6	50,0	22,1
Fucus (<i>Fucus serratus</i> L.)		27,0	34,7	48,5	18,4
<i>Cladophora fracta</i>	19,8	37,5	34,3	0,46	19,2
<i>Bacillus megatherium</i> Bary	23,6	11,1	22,8	4,16	13,2

NOM DES PLANTES	MATIERE SÈCHE p. 100	CENDRES p. 100 de matière sèche	K en grammes de matière sèche	Na par kilogramme de matière sèche	RUBIDIUM en milligrammes par kilogramme de matière sèche
Champignons ascomycètes :					
Ergot de seigle (<i>Clavicus purpurea</i> Tul.)	94,0	3,4	8,7	0,07	6,4
Pezize (<i>Peziza aurantia</i> Persoon)		11,3	21,9	0,34	4,8
<i>Penicillium notatum</i> Westling	16,4	7,2	1,6	8,62	7,9
Helvelle (<i>Helvella crispa</i> Fries)	13,1	10,7	35,5	0,20	63,5
Champignons basidiomycètes					
Angiocarpes :					
<i>Scleroderma aurantium</i> Persoon	16,9	4,8	19,9	0,11	115
Vesse de loup (<i>Lycoperdum gemmat.</i> Batsch)		7,6	24,1	0,15	18,9
<i>Phallus impudicus</i> (œuf) L.		4,5	17,1	0,37	23,7
Champignons basidiomycètes					
Gymnocarpes :					
Clavaire (<i>Clavaria botrytis</i> Persoon)	11,1	6,9	33,2	0,18	133
Clavaire (<i>Clavaria stricta</i> Persoon)	7,6	5,5	28,2	0,15	174
Chanterelle (<i>Cantharellus cibarius</i> Fries)	14,0	7,2	41,4	0,22	232
Corne d'abondance (<i>Craterellus cornucopioides</i> Persoon)	13,2	9,0	50,0	0,37	65,7
<i>Hydnum coralloides</i> Fries	24,7	4,1	23,4	0,14	124
Foie de veau (<i>Fistulina hepatica</i> Fries)	8,8	7,7	42,0	0,19	83,4
<i>Ganoderma lucidum</i> Karsten	30,4	1,9	3,5	0,11	12,4
<i>Lenzites flaccida</i> B.	51,3	1,4	2,9	0,03	13,0
<i>Fomes betulinus</i> Karsten	19,1	2,6	10,1	0,04	5,0
Poule des bois (<i>Polyporus frondosus</i> Karsten)	18,2	5,1	23,7	0,19	113
<i>Polyporus zonatus</i> Fries	41,8	1,1	2,2	0,05	2,8
Champignons basidiomycètes					
Hemiangiocarpes :					
Bolet (<i>Boletus edulis</i> Fries)		6,0	29,9	0,43	110
<i>Boletus aurantiacus</i> Buliard	9,4	5,3	15,7	3,4	123
<i>Boletus erythropus</i> Fries		5,5	20,7	0,28	84
<i>Paxillus atrolineatus</i> Fries	10,6	5,3	18,6	1,92	100
<i>Paxillus involutus</i> Fries	8,6	10,9	63,3	0,36	352
<i>Russula aurora</i> Krombh		7,1	39,1	0,41	52,6
<i>Russula cyanorantha</i> Fries	10,4	7,1	32,6	0,61	204
<i>Russula nigricans</i> Fries	9,2	6,6	31,1	0,20	74,0
<i>Russula virescens</i> Fries		6,7	28,7	0,18	94,6
<i>Lactarius controversus</i> Fries		5,7	22,0	0,13	9,3
<i>Lactarius d-litosus</i> Fries	16,0	5,0	19,6	0,14	13,0
<i>Lactarius pyrogalus</i> Fries		6,9	31,6	0,15	159
<i>Lactarius subdulcis</i> Fries	10,8	5,6	29,0	0,19	73,5
<i>Lactarius torminosus</i> Fries	17,5	5,5	23,5	0,22	83,1
<i>Lactarius vellereus</i> Fries		7,7	40,4	0,45	13,9

NOM DES PLANTES	MATIERE SÈCHE p. 100	CENDRES p. 100 de matière sèche	K en grammes de matière sèche	Na par kilogramme de matière sèche	RUBIDIUM en milligrammes par kilogramme de matière sèche
<i>Pleurotus cornucopiae</i> Gillet . . .	8,6	8,3	31,4	0,44	72,4
<i>Clytocybe aurantiaca</i> -tuder . . .	34,1	5,4	11,0	0,45	17,9
<i>Clytocybe nebularis</i> Quélet . . .	11,5	10,1	36,6	0,18	211
Armillaire (<i>Armillariella mellea</i> Karsten)	40,5	9,3	45,0	0,23	25,4
Colombette (<i>Tricholoma columbella</i>) Quélet	8,3	11,4	54,7	0,56	1.151
<i>Tricholoma glaucocanum</i>		9,8	34,8	0,19	557
<i>Tricholoma nudum</i> Quélet	8,5	12,8	49,9	0,34	18,2
<i>Tricholoma portentosum</i> Quélet . . .	15,3	9,5	51,6	0,24	834
<i>Tricholoma rutilans</i> Quélet	8,5	4,6	26,6	0,67	90
<i>Tricholoma saponaceum</i> Quélet . . .	10,2	12,5	62,5	0,41	317
<i>Tricholoma sulfureum</i> Quélet		7,5	37,6	0,17	302
<i>Mucidula radicata</i> Boursier	7,1	8,4	52,3	0,83	19,3
Entolome (<i>Entoloma lividum</i>) Quélet .		10,0	49,1	0,43	779
<i>Cortinarius Berkeleyi</i> Cooke		6,9	1,2	8,4	491
<i>Cortinarius largus</i> Fries		6,4	11,9	13,5	219
<i>Cortinarius violaceus</i> Fries		11,6	44,0	0,81	1.510
<i>Pholiota squarrosa</i> Quélet		8,0	39,9	9,90	165
<i>Pholiota spectabilis</i> Quélet	7,7	5,1	25,6	1,14	31,4
<i>Nematoloma fasciculare</i> Karsten . .	9,5	5,6	27,8	0,42	36
Coprin chevelu (<i>Coprinus comatus</i> Fries)	7,2	11,6	52,6	0,53	28
Coprin encrier (<i>Coprinus atramentarius</i>) Fries	4,6	15,8	26,6	0,24	13
Agaric des prés (<i>Agaricus campester</i>) L.	9,9	12,0	40,3	0,91	28,9
Champignon de couche (<i>Agaricus hortensis</i>) .		5,7	35,4	0,57	42,7
<i>Pluteus cervinus</i> Quélet	6,6	10,2	41,9	5,05	252
Coulemelle (<i>Lepiota procera</i> Quélet). .	14,0	9,5	41,6	0,34	29,9
Am. phalloïde (<i>Amanita phalloïdes</i>) Quélet	6,5	10,8	56,1	1,18	117
Am. tue-mouches (<i>Amanita muscaria</i>) Quélet	11,5	7,3	43,5	0,18	61,8
Am. panthère (<i>Amanita pantherina</i>) Quélet	7,0	12,8	58,6	3,97	210
Am. vineuse (<i>Amanita rubescens</i>) Quélet	5,0	11,2	57,5	0,74	103

matière sèche, il en a été rencontré de 2,4 mg. (dans le Lichen de Rennes) à 1.510 mg. (dans le Cortinaire violet), soit en moyenne 20 mg. par kilogramme de matière sèche chez les Phanérogames et 120 mg. chez les Cryptogames.

Parmi ces derniers, ce sont les Champignons qui manifestent au plus haut point la propriété d'emmagasiner le rubidium. Leur teneur moyenne s'élève à 150 mg. par kilogramme sec, tandis que celle des autres plantes cryptogames est d'environ 30.

Etant donné le nombre élevé des espèces de Champignons, la variété de leur forme et de leur habitat, on rencontre de grandes

différences de teneur en rubidium lorsqu'on passe d'une espèce à une autre : il y a des espèces très pauvres, il y en a, au contraire, de relativement très riches.

Parmi les premières se trouvent les espèces lignicoles, extrêmement nombreuses, qui vivent aux dépens des arbres malades et des vieilles souches, sur du bois mort, des racines mortes et enterrées. Les unes sont de consistance en quelque sorte ligneuse comme *Fomes betulinus*, *Lenzites flacida*, *Polyporus zonatus*, *Ganoderma lucidum*, dans lesquelles il y a moins de 20 mg. de rubidium par kilogramme de matière sèche ; les autres ont une consistance moins résistante, seulement fibreuse, cartilagineuse ou même, plus ou moins spongieuse, par exemple, *Armillaria mellea*, *Collybia fusipes*, *Nematoloma fasciculare*, *Pholiota spectabilis*, *Mucidula radicata* dans lesquelles la teneur en rubidium reste comprise entre 20 et 40 mg.

Cependant, il existe d'assez nombreuses espèces, croissant sur des souches, des branches tombées ou de vieux troncs, des amas de brindilles, voire des tas de sciure, qui renferment des proportions de rubidium plus voisines de la moyenne, c'est ainsi qu'il a été dosé dans *Fistulina hepatica* 83,4 mg., dans *Polyporus frondosus* 112,5 mg., dans *Clavaria stricta* 174 mg. et, même, dans *Pluteus cervinus* 252 mg. Mais, d'une manière très marquée, l'alimentation franchement ligneuse a comme conséquence une teneur en rubidium faible ou très faible. A cet égard, le cas des deux espèces de *Paxillus* qui ont été analysées est à remarquer : tandis que *P. involutus*, que l'on trouve souvent sur les talus et au bord des fossés, contenait 352 mg. de rubidium, *P. atrotomentarius*, qui vit au pied des souches, ne renfermait que 100 mg.

Par contre, il y a chez les espèces de Champignons qui se développent aux dépens de la matière organique du sol, apparaissent à sa surface et sont d'une consistance charnue plus ou moins spongieuse, des exemples d'accumulation du rubidium tout à fait surprenantes ; tels sont ceux de certaines espèces de Basidiomycètes appartenant aux genres *Cortinarius* et *Tricholoma*.

Il y a, en effet, dans les 3 Cortinaires et les 7 Tricholomes que nous avons analysés :

	MG.		MG.
<i>Cortinarius Berkeleyi</i>	491	<i>Tricholoma nudum</i>	18,2
<i>Cortinarius largus</i>	219	<i>Tricholoma portentosum</i>	834
<i>Cortinarius violaceus</i>	1.510	<i>Tricholoma rutilans</i>	90
<i>Tricholoma columbetta</i>	1.151	<i>Tricholoma saponaceum</i>	317
<i>Tricholoma glaucocanum</i>	557	<i>Tricholoma sulfureum</i>	302

Le chiffre trouvé pour *Tricholoma nudum* est très inférieur à ceux des autres espèces du même genre, mais il faut retenir que René Maire a reconnu à ce Champignon des caractères qui le rangeraient plutôt dans le genre *Rhodopaxillus*.

La disproportion de teneur en rubidium entre les Cryptogames et les Phanérogames présente un réel intérêt au point de vue de la Biochimie comparée : les premiers de ces végétaux, d'apparition plus ancienne à la surface du Globe, ne seraient pas seulement d'une organisation moins parfaite, mais ils possèderaient une autre composition chimique (du moins quantitative) en rapport avec un comportement physiologique et des besoins alimentaires différents.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 6 mars 1947.

COMMUNICATIONS

NOTE SUR LE VIRUS DE CARRÉ ADSORBÉ SUR HYDROXYDE D'ALUMINIUM ET DÉSSÉCHÉ VACCINATION DU FURET

par PIERRE GORET et M^{lle} G. YVORE.

Dans une note antérieure (1), l'un de nous a montré que la dessiccation du complexe virus de Carré-hydroxyde d'aluminium permettait d'obtenir un vaccin vivant et avirulent pour le furet. Nous avons poursuivi nos recherches en la matière. Celles-ci ont dans l'ensemble confirmé nos premiers résultats mais elles nous ont, en outre, permis d'apporter quelques précisions relatives à la préparation du vaccin, à l'immunisation des animaux et à la nature du complexe desséché obtenu.

A. ADSORPTION DU VIRUS. — 1. *Pouvoir d'adsorption de l'hydroxyde d'aluminium utilisé.* — L'hydroxyde d'aluminium préparé suivant la technique fort simple que nous avons exposée est très impur. Il est, en réalité, constitué par un mélange d'oxyde et d'hydroxyde d'aluminium en précipité grumeleux et floconneux. Il renferme de nombreuses impuretés et n'a qu'un pouvoir adsorbant extrêmement faible sur le rouge Congo (2).

Il s'en suit que le mélange virus-hydroxyde forme un complexe très labile expliquant sa haute virulence à l'état frais. Nous nous sommes d'ailleurs convaincus de cette faible adsorption du virus. En effet si on lave le complexe (renfermant jusque 20 et 40 mg. de virus par

(1) P. GORET, *Ces Annales*, 1946, 72, 53.

(2) Vérification opérée par M. le Dr Moosbrugger, directeur de l'Institut de Vaccination contre la fièvre aphteuse à Bâle, suivant la méthode de Waldmann perfectionnée par l'emploi de la mesure photo-électrique de l'absorption de la lumière.

centimètre cube) par l'eau distillée, le liquide surnageant, après centrifugation, demeure, dans la règle, avirulent. Mais si les lavages sont pratiqués au moyen de la solution saline physiologique le liquide surnageant est alors virulent et il le demeure au cours des lavages successifs. L'élu­tion du virus s'opère donc aisément sous la seule action de l'eau salée physiologique.

De plus, les préparations d'hydroxyde sont très inégales et toutes ne possèdent pas les mêmes qualités. Certaines ont un pouvoir d'adsorption plus élevé, d'autres plus faible. Il en résulte que, parfois, le complexe, à l'état frais, demeure avirulent pour le furet et que d'autres fois, en revanche, le complexe desséché, contrairement à la règle, peut transmettre l'infection, à la faveur du virus non adsorbé avant dessiccation.

A la suite de cette constatation nous avons régulièrement soumis l'adsorbat au lavage par l'eau distillée. Après centrifugation le liquide surnageant est rejeté, le culot, repris par l'eau, est soumis à la dessiccation. On évite ainsi la présence de toute trace de virus non adsorbé.

2. *Action de la dessiccation.* — Après dessiccation et reprise par l'eau le complexe a, contrairement à ce que nous avions d'abord cru observer, un aspect différent de l'adsorbat frais. La suspension obtenue n'est pas la même et l'hydroxyde d'aluminium colloïdal primitif n'est pas reconstitué. Nous nous sommes adressés à de l'hydroxyde d'aluminium très purifié que nous avons soumis à la dessiccation. Comme il fallait s'y attendre, après reprise par l'eau, on obtient une suspension d'oxyde d'aluminium insoluble dans l'eau, se déposant avec rapidité et foncièrement différente de la suspension colloïdale primitive. Si la différence est moins accusée avec l'hydroxyde utilisé par nous, c'est que celui-ci contient sûrement, comme nous l'avons dit, de nombreuses impuretés.

Quoi qu'il en soit, le complexe obtenu après dessiccation de l'adsorbat se montre avirulent et immunisant pour le furet. Mais l'élu­tion du virus s'était révélée impossible en reprenant la masse desséchée par du bouillon ou une solution tampon de phosphates.

Nous avons pu l'obtenir aisément au moyen d'une solution à 20 pour 100 de sel de Seignette (3). L'adsorbat desséché repris par cette solution ne se dissout qu'en faible partie, mais la suspension obtenue inoculée au furet lui transmet régulièrement l'infection ainsi, d'ailleurs, que le liquide surnageant obtenu, par centrifugation de l'adsorbat, après traitement par le sel de Seignette.

Il en résulte donc, comme nous le pensions, que le virus au sein de l'hydroxyde desséché a conservé sa vitalité et sa virulence.

B. *POUVOIR IMMUNISANT DU COMPLEXE DESSÉCHÉ.* — Nous ne saurions donner, dans le cadre de cette note, un compte rendu complet des multiples expériences de vaccination que nous avons pratiquées depuis deux ans sur le furet.

Le détail en a d'ailleurs été communiqué ailleurs (4).

Nous avons utilisé successivement des suspensions de virus à des taux

(3) Sur les conseils de M^{lle} Faure que nous remercions vivement des renseignements qu'elle a bien voulu nous communiquer.

(4) Société des sciences vétérinaires de Lyon. Séance du 2 mars 1947 (sous presse).

variables (20, 40, 80 mg.) mélangées, à *parties égales*, avec l'hydroxyde d'aluminium ou avec l'hydroxyde d'aluminium dilué par l'eau distillée, à parties égales, ou à raison de 1 partie d'eau pour 2 parties d'hydroxyde. On a fait appel à des solvants variés pour reprendre le complexe desséché : eau distillée, eau salée physiologique, bouillon, solution tampon de phosphate. Les animaux furent éprouvés, au moyen d'une dose sévère de virus (10 mg.) dans des délais variant de douze à vingt-trois jours après la vaccination. Au cours de ces essais la quantité de vaccin utilisé correspondait à 1 cm³ d'adsorbat liquide frais.

En ces conditions, les résultats suivants ont été obtenus :

1° *Virus + hydroxyde à parties égales* : immunité régulière assurée dans 50 pour 100 des cas seulement. Si le complexe est lavé avant dessiccation le taux des animaux immunisés s'élève à 75 pour 100. Sans doute ce lavage supplémentaire, en éliminant une nouvelle partie d'impuretés, permet-il une meilleure immunisation.

2° *Virus + hydroxyde dilué par l'eau à parties égales* : immunité régulièrement obtenue dans 100 pour 100 des cas, mais 50 pour 100 des animaux contractent l'infection à la suite de la vaccination.

3° *Virus + hydroxyde dilué par l'eau à raison de une partie d'eau et de deux parties d'hydroxyde* : immunité régulièrement obtenue dans 100 pour 100 des cas, mais 25 pour 100 environ des animaux contractent l'infection à la suite de la vaccination.

Les deux dernières préparations ne sauraient être utilisées puisque le vaccin se révèle virulent, une grande partie de l'élément infectieux restant sans aucun doute inadsorbé.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons utilisé des suspensions contenant 40 mg. de virus, mélangées à parties égales avec l'hydroxyde d'aluminium (le vaccin desséché contient donc 20 mg. de virus par centimètre cube). Le complexe est lavé avant dessiccation, il est repris par l'eau physiologique. Les furets reçoivent 2 cm³ du vaccin.

Tous les animaux traités résistent à l'épreuve pratiquée vingt-et-un jours plus tard ; aucun d'eux ne succombe lors de l'injection du vaccin.

Il ressort de ces essais que l'immunité résultant de l'injection d'un vaccin contenant 40 mg. de virus adsorbé sous le volume de 1 cm³ renfermant 0,5 cm³ d'hydroxyde d'aluminium demeure très incomplète. En revanche une même quantité de virus adsorbé injecté sous un volume double renfermant une quantité double d'hydroxyde d'aluminium confère une résistance solide.

En fait, ainsi qu'il est dit plus haut, nous ignorons si le produit final obtenu renferme encore de l'hydroxyde d'aluminium ou s'il est constitué uniquement par de l'oxyde d'aluminium joint à des impuretés. Néanmoins nous constatons le fait, qui paraît confirmer la notion bien établie de l'influence de la quantité d'hydroxyde d'aluminium dans les processus d'immunisation par virus adsorbé.

Les résultats *expérimentaux* acquis chez le chien sont plus nets encore que ceux obtenus avec le furet. En effet, le vaccin, à la dose de 1 cm³ confère l'immunité à l'animal.

Mais, dans la *pratique*, la méthode s'est révélée assez décevante : environ 20 p. 100 des chiens vaccinés demeurent sensibles à la maladie naturelle dans des délais variables.

Les raisons en sont multiples et ce n'est pas le lieu de les exposer

ici (5) ; l'une d'elles, cependant, ressortit, sans doute comme chez le furet, à la quantité insuffisante de vaccin injecté.

C. NATURE DU COMPLEXE IMMUNISANT. — A la lumière des essais relatés ci-dessus, il apparaît que l'action immunisante de l'adsorbat desséché est comparable à celle des autres vaccins adsorbés sur hydroxyde d'aluminium. Le virus élué lentement dans l'organisme, à dose infra-virulente, est capable de conférer l'immunité à la faveur de l'hydroxyde d'aluminium jouant le rôle de substance adjuvante et stimulante de l'immunité.

Nous avons même observé sur le furet des faits comparables à ceux signalés par Mohlmann (6) dans l'immunisation anti-aphteuse des cobayes par de faibles quantités d'antigène, savoir une nette hypersensibilité au virus des sujets vaccinés avant l'installation de l'immunité. Quand les épreuves sont pratiquées sur le furet vacciné, avant le dixième jour suivant la vaccination, celui-ci présente une maladie plus grave et plus rapide que les animaux témoins (7).

Mais, comme nous l'avons souligné dès le début de notre exposé, le produit final obtenu ne saurait être comparé à l'hydroxyde d'aluminium très purifié, habituellement utilisé pour l'adsorption des virus ; en outre, le produit original n'est pas non plus comparable et ne présente qu'un faible pouvoir d'adsorption.

Dans notre précédente note, nous posions la question de savoir « si la congélation, en concentrant la phase aqueuse, permet une union plus intime entre les micelles colloïdales et les éléments virulents et une plus grande stabilité du complexe » en accord avec les constatations de G. Pyl, K. O. Hobohm et K. Holtz, sur le vaccin anti-aphteux adsorbé et congelé (ce qui entraîne une déshydratation des micelles).

Il semble bien que ce mécanisme puisse être invoqué. Mais dans le cas particulier, la congélation seule n'explique pas le phénomène. En effet, notre adsorbat congelé, puis décongelé, s'est révélé, à maintes reprises, virulent sans qu'il soit besoin de broyer les fragments d'alumine en suspension (8).

Bien plus, quand une décongélation suivie d'une recongélation se produit au premier stade de la dessiccation, le produit final desséché se révèle virulent. La prise en masse du produit est nécessaire, la décongélation libère une partie du virus qui demeure inadsorbé.

Nous pensons donc que, sous l'influence de la dessiccation, le virus, dont l'adsorption est réelle, mais insuffisante, sur cet hydroxyde d'aluminium de mauvaise qualité, peut être masqué à la suite des modifications subies par les micelles lors de la déshydratation.

Son élution difficile (après dessiccation) *in vitro* se réalise *in vivo*.

(5) Voir à ce sujet notre communication à la Société des sciences vétérinaires de Lyon.

(6) *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1942, 401, 269.

(7) Nous avons en 1936 (*Bull. Acad. Vétér. France*, 1936, 9, 388) signalé l'hypersensibilité au virus des furets en incubation.

(8) Après une conservation de quatre jours à la température du laboratoire de tels adsorbats congelés puis décongelés étaient encore virulents. Le virus paraît maintenir son activité au sein de l'hydroxyde d'aluminium plus longtemps qu'en simple suspension aqueuse.

Elle n'est d'ailleurs possible que parce que l'hydroxyde d'aluminium utilisé est mauvais adsorbant.

L'expérience suivante le prouve.

On utilise un hydroxyde d'aluminium très purifié, provenant du Danemark (9), pour la préparation du vaccin. Le virus est énergiquement adsorbé : en effet, tous les furets ne succombent pas à l'inoculation du complexe liquide frais comme cela se produit avec notre hydroxyde, et les sujets qui résistent sont solidement immunisés. *Toutefois, le complexe desséché avirulent ne confère pas l'immunité.* En présence d'un hydroxyde très adsorbant, le virus solidement accroché aux micelles après déshydratation ne peut plus se détacher de son support et ne s'élué pas dans l'organisme.

Cette hypothèse paraît être confirmée par des expériences poursuivies avec le virus aphteux.

Des essais de dessiccation du vaccin anti-aphteux type Waldmann ont été tentés par le Docteur Moosbrugger et le Docteur Fogedby (10).

Le Docteur Moosbrugger a réussi à vacciner le cobaye au moyen du vaccin adsorbé desséché. En revanche, ce même vaccin inoculé au bovin dans la muqueuse linguale a infecté les animaux.

Notre éminent collègue pense que la dessiccation très poussée entraîne la destruction des micelles, ce qui permet la libération du virus.

Ce virus formolé et chauffé vaccine le cobaye mais est insuffisamment atténué pour le bovin en l'absence de l'hydroxyde d'aluminium adsorbant.

Utilisant un hydroxyde d'aluminium très pur, fabriqué en France, nous avons, nous-mêmes, dans une expérience, transmis la maladie au furet par l'adsorbat desséché. Sans doute, l'hydroxyde utilisé, encore qu'excellent adsorbant, se prêtait-il mal à cette expérience de dessiccation.

Le Docteur Fogedby a réalisé la même expérience sur cobayes. Le vaccin desséché n'a pas infecté les animaux mais n'a pas davantage conféré l'immunité. Mais en broyant finement au mortier le produit desséché, comme Pyl, Hobohm et Holtz broient l'adsorbat congelé, le vaccin a pu être récupéré.

En résumé, on peut conclure qu'en ce qui concerne le virus de Carré, l'adsorption sur un hydroxyde d'aluminium non purifié et de pouvoir adsorbant faible aboutit à un complexe virus + hydroxyde d'aluminium très labile dont la stabilité est assurée par la dessiccation, mais de telle sorte que l'éluion *in vivo* du complexe desséché est encore possible, permettant d'obtenir, chez le furet, une immunité solide par injection de doses de vaccin convenablement choisies.

Le résultat ne peut être obtenu en utilisant un hydroxyde d'aluminium très purifié et de pouvoir adsorbant élevé. La dessiccation du complexe aboutit, dans ce cas, à un produit dont l'action varie vraisemblablement en fonction de l'intensité de la dessiccation et aussi de la qualité et de la nature de l'hydroxyde d'aluminium : le complexe desséché se montre, en effet, virulent ou avirulent, mais non immunisant.

(9) Dû à l'obligeance de M. le Dr Fogedby, directeur du centre anti-aphteux de l'île de Lindholm.

(10) Communication orale personnelle de recherches encore inédites.

Il serait intéressant de voir si ces résultats pourraient être confirmés par des recherches du même ordre effectuées sur d'autres ultravirus.

Si le virus de Carré se prête bien à ces essais, on ne peut en conclure que les autres ultravirus se comportent de même.

Nous pensons, en tout cas, que pour chacun d'eux doit exister, en regard d'un hydroxyde d'aluminium choisi, un phénomène « d'adsorption minimum » renforcé par la dessiccation et permettant une élution ultérieure *in vivo*.

C'est ce que nous apprendrons, nous l'espérons, des recherches actuellement en cours qui, malheureusement, ont dû être de nombreuses fois interrompues, étant donné les difficultés actuelles d'approvisionnement en matériel et en animaux.

L'intérêt de la méthode réside dans le fait que les vaccins ainsi préparés se conserveraient pendant un temps très long, sans précaution spéciale. Ils pourraient cependant présenter, pour les ultravirus doués d'une pluralité de types, un sérieux inconvénient.

Récemment (11), en effet, E. Michelsen et K. Hikkelsen ont montré que, sous l'influence de la dessiccation, le virus aphteux, d'un type donné, était susceptible de se transformer en un type aberrant mal défini. Ce virus, partant, ne pourrait être utilisé pour la vaccination spécifique.

ADAPTATION D'UN MILIEU À LA BASE DE DIGESTION PAPAINIQUE DE VIANDE POUR LA PRODUCTION RÉGULIÈRE DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE AVEC LA SOUCHE WOOD

par P. MERCIER et J. PILLET.

Les faits sont nombreux qui montrent les possibilités d'adaptation d'un microbe à un milieu de culture et l'influence de celui-ci sur la biologie du germe.

Par suite d'une baisse marquée et persistante du pouvoir toxigène de la souche 72 (Nélis) que nous utilisons jusqu'à présent pour la production régulière de la toxine staphylococcique, nous avons, nous-mêmes, cherché à adapter la souche de staphylocoques toxigènes Wood 46 à un milieu de préparation facile permettant l'élaboration de toxine de titre élevé. Ce sont les résultats de ce travail que nous exposons aujourd'hui dans cette note.

La souche Wood est fréquemment employée à l'étranger pour l'obtention de l'hémolysine α , généralement sur milieu semi-solide, à notre avis, assez peu favorable à une production d'une certaine importance (difficulté de filtration).

(11) *Acta Path. et Microb. Scand.*, 1945, **22**, 406.

En France, G. Ramon, A. Boivin et R. Richou (1) ont mis au point un milieu semi-synthétique permettant d'obtenir, à partir de la souche Wood, une bonne toxine, mais ce milieu nécessitant la présence d'acides aminés coûteux et difficiles à obtenir dans le commerce, nous ne l'avons employé que peu de temps et l'avons remplacé par le milieu de digestion papainique de viande (2), adapté à la souche Wood, dans les conditions suivantes :

Nous avons choisi une concentration en azote total de l'ordre de 4,5 p. 1.000, intermédiaire entre celle du milieu semi-synthétique 1,5 p. 1.000 en moyenne et celle du milieu de digestion papainique, 6 p. 1.000. La plus grande partie de l'azote total provient du milieu papainique (92 p. 100). Le reste est apporté par l'hydrolysate de gélatine. Nous avons ajouté, au milieu initial de digestion papainique, du glucose et certains sels qui se sont révélés utiles à la culture du staphylocoque et à sa toxinogénèse.

La composition du milieu est la suivante :

Citrate de soude trisodique	3 g.
Glucose	2 g.
Hydrolysate de gélatine	20 cm ³
Milieu de digestion papainique	800 cm ³
Eau	Q. S. 1.000 cm ³

Réparti sous le volume d'un litre dans des ballons de Fernbach, ce milieu ensemencé avec la souche de Wood et cultivé dans les conditions habituelles, a permis la production régulière de toxine de titre élevé. Les proportions de divers constituants ont été déterminées après étude de l'influence de chacun d'eux sur la toxinogénèse, ainsi que le met en évidence le tableau suivant, qui précise l'importance de l'adjonction au milieu initial d'hydrolysate de gélatine et de certains sels, et qui montre l'action partiellement inhibitrice du phosphate de potassium.

La teneur en azote total de 4,5 p. 1.000 représente la concentration

HYDROLYSAT de gélatine	PHOSPHATE monopotassique	CITRATE trisodique	GLUCOSE	MOYENNE en unités des toxines obtenues au cours de 4 séries d'expériences
—	+	—	—	5,3
—	—	+	—	7,5
—	—	—	+	13,5
—	+	+	—	11
—	+	—	+	11,5
—	—	+	+	17,5
—	+	+	+	13,5
—	—	—	—	9
+	+	+	+	15
+	—	+	+	19

(1) G. RAMON, A. BOIVIN et R. RICHOU, *C. R. Acad. Sc.*, 1938, 207, 466.

(2) G. RAMON, P. MERCIER, J. POCHON et Mlle AMOUREUX, *C. R. Soc. Biol.*, 1942, 136, 329.

optima, des essais systématiques ayant montré, pour des concentrations supérieures et inférieures, un abaissement du titre toxique.

Ce milieu présente, en outre, un double avantage sur les milieux précédemment utilisés : d'une part, la transformation de la toxine en son dérivé anatoxique s'effectue rapidement, en une semaine au plus, avec une minime proportion de formol (4 p. 1.000). D'autre part, cette transformation n'entraîne pas de perte sensible de la valeur antigénique, contrairement à ce que l'on constatait avec les toxines de titre élevé obtenues sur milieu semi-synthétique.

Injectée chez l'homme ou chez l'animal, l'anatoxine préparée dans ces conditions, assure une immunité aussi efficace que celle qui pouvait être obtenue avec le même antigène élaboré sur d'autres milieux.

UNE NOUVELLE RÉACTION D'ALLERGIE DANS LA TUBERCULOSE

par R. CHAUSSINAND

Dans des publications antérieures (1), nous avons insisté sur le fait qu'après vaccination par le BCG, une intradermo-réaction négative à 1 et même à 2 cg. (2) de tuberculine brute n'indiquait pas toujours un état d'anergie complet. Entre une allergie très faible, encore décelable par les réactions tuberculiniques, et une anergie vraie, nous admettions l'existence de différents stades d' « allergie déclinante ». Cette affirmation était basée sur les constatations suivantes : La vaccination par le BCG buccal ne rend qu'environ 50 p. 100 des sujets sensibles à une réaction de Mantoux à 1 cg. de tuberculine brute (3). Il est cependant possible de démontrer qu'un certain degré d'allergie peut exister chez des enfants vaccinés *per os*, bien qu'ils ne réagissent pas ou ne réagissent plus à 1 cg. de tuberculine intradermique. En effet, si l'on revaccine *par voie sous-cutanée* (0,01 mg. de BCG), *avant l'âge de deux ans*, des enfants insensibles à 1 cg. de tuberculine brute ayant absorbé du BCG *per os* à leur naissance, on constate, chez environ 11 p. 100 d'entre eux, la formation d'abcès froids. Tandis que chez les enfants de même âge, *non vaccinés à la naissance* et insensibles à la tuberculine, ou chez les vaccinés ne réagissant pas à la tuberculine, *âgés de plus de deux ans*, l'injection de 0,01 mg. de BCG ne produit qu'exceptionnellement un abcès froid (0,5 p. 100 au maximum). Ces nombreux abcès froids, observés après revaccination sous-cutanée chez les vaccinés âgés de moins de deux ans, insensibles à 1 cg. de tuber-

(1) R. CHAUSSINAND, *Far Eastern Assoc. Trop. Med.*, 1938, 2, 567. — Id., *Bull. Acad. Méd.*, 1939, 121, 669. — Id., *Rev. Tub.*, 1939-1940, 5, 916.

(2) Les essais, faits avec 2 cg. ne nous ont pas donné, en pratique, des résultats positifs plus nombreux que la réaction de Mantoux à 1 cg., et cela même dans la vaccination au BCG *per os* où la sensibilité tuberculinique ne se développe que d'une manière peu intense.

(3) R. CHAUSSINAND, *Rev. Hygiène et Méd. prév.*, 1938, 60, 271.

culine, ne peuvent être dus qu'à des « phénomènes de Koch » et démontrent, chez ces sujets, l'existence d'un certain degré d'allergie bactérienne spécifique. Nous basant sur ces constatations, nous écrivions en 1939 (1) : « Il y a une dizaine d'années, on considérait comme anergique un enfant insensible à 1 mg. de tuberculine brute intradermique. Actuellement, ne sont déclarés anergiques que les sujets ne réagissant pas à 1 ou même à 2 cg. Il est probable que dans l'avenir, des moyens plus sensibles nous permettront de reconnaître que le seuil de l'allergie se trouve encore plus bas ».

*
* *

En vue de rechercher dans la tuberculose une réaction d'allergie plus sensible que les réactions tuberculiniques, nous avons expérimenté l'action de différents antigènes à base de bacille de Koch. La technique suivante nous a donné les meilleurs résultats.

PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE. — 100 mg. de bacilles de Koch provenant d'une culture sur milieu solide à l'œuf (Petragnani, Löwenstein, Petroff, etc...), âgée de cinq à six semaines, sont broyés dans un verre à pied ou dans un ballon contenant des billes de verres de 2 à 3 mm. de diamètre, puis émulsionnés dans 100 cm³ d'eau physiologique. La suspension bacillaire est aspirée à la pipette et portée dans un ballon qu'on scelle au chalumeau. Le ballon est ensuite chauffé pendant une heure dans un bain-marie à 100°. Le contenu du ballon est finalement réparti en ampoules de 1 cm³. Toutes les manipulations sont faites aseptiquement. L'eau physiologique et le matériel de laboratoire sont préalablement stérilisés. L'antigène ainsi préparé conserve ses propriétés pendant plusieurs mois.

Pour la préparation de l'antigène, on peut utiliser non seulement des souches de bacilles de Koch de type humain ou bovin, mais encore des cultures de BCG âgées de quatre semaines. Le médecin n'ayant pas de laboratoire de bactériologie à sa disposition peut facilement préparer un antigène de la façon suivante : Chauffer pendant une heure dans un bain-marie à 100° une ampoule de vaccin BCG buccal délivrée par l'Institut Pasteur. Mélanger soigneusement dans un verre stérilisé 1 cm³ de vaccin BCG chauffé et 4 cm³ d'eau physiologique stérilisée. 0,1 cm³ de la suspension bacillaire ainsi obtenue contient environ 0,1 mg. de BCG.

MODE D'INJECTION DE L'ANTIGÈNE. — L'injection de l'antigène est pratiquée par voie intradermique à la dose de 0,1 cm³ (0,1 mg. de bacilles de Koch chauffés) sur la partie interne de l'avant-bras.

OBSERVATION DES RÉSULTATS. — Pour l'étude des résultats, nous voyons les sujets éprouvés après vingt-quatre heures et quarante-huit heures, puis une fois par semaine pendant un mois. En pratique courante, il suffit de contrôler les résultats une et deux semaines après l'injection.

CARACTÉRISTIQUES DE LA RÉACTION. — Quand la réaction est négative, on observe uniquement au lieu d'injection une très légère rougeur d'origine traumatique qui peut persister quelques jours.

La réaction positive se manifeste d'ordinaire déjà vingt-quatre heures et quarante-huit heures après l'injection par un processus inflammatoire aigu localisé, plus ou moins prononcé, avec congestion et œdème. Les jours suivants, il se forme une petite infiltration chronique d'aspect nodulaire et de couleur violacée qui augmente de volume et atteint son acmé au bout de une à deux semaines. *Cette infiltration nodulaire constitue la réaction positive proprement dite.* Dans les réactions très fortes, le centre du nodule s'ulcère et laisse sourdre une sérosité purulente. L'involution de l'infiltration s'effectue graduellement. Dans les réactions très fortes, cette régression peut avoir une durée de plus de deux mois. Les réactions positives non ulcérées ne laissent généralement pas de traces.

NOTATION DES RÉSULTATS. — Nous employons les signes conventionnels suivants :

+++ Réactions positives très fortes : infiltrations nodulaires de plus de 1 cm. de diamètre ou plus petites mais ulcérées.

++ Réactions positives fortes : infiltrations de 0,5 cm. à 1 cm.

+ Réactions positives faibles : infiltrations de 0,3 cm à 0,5 cm.

— ? Réactions négatives douteuses : minuscule infiltration ou rougeur persistant plus de deux semaines.

— Réactions négatives : pas de réaction ou légères traces pendant quelques jours.

*
* *

La nouvelle réaction d'allergie dans la tuberculose, dont nous venons de décrire la technique, est une réaction d'allergie bactérienne spécifique. L'homme et le cobaye non infectés de tuberculose et vaccinés par le BCG ne réagissent pas à cette réaction, tandis que les organismes tuberculeux ou vaccinés par le BCG présentent des réactions positives plus ou moins fortes (4).

L'expérimentation démontre, en outre, que cette nouvelle réaction d'allergie dans la tuberculose est d'une sensibilité manifestement supérieure à celle reconnue aux réactions tuberculiniques. Ainsi l'organisme infecté de tuberculose réagit d'ordinaire à cette nouvelle réaction avant que l'allergie tuberculinique apparaisse. Mais cette plus grande sensibilité se constate surtout au cours des recherches de l'allergie après vaccination par le BCG. En effet, cette réaction donne alors non seulement des résultats plus précoces que les réactions tuberculiniques, mais elle se montre encore positive chez les anciens vaccinés quand l'intradermo-réaction à 1 cg. de tuberculine brute est déjà devenue franchement négative. Cette réaction se révèle même souvent positive sur des organismes vaccinés au BCG *per os* n'ayant jamais réagi à 1 cg. de tuberculine brute. Il résulte de ce qui précède que l'emploi

(4) Cependant les lépreux de type nerveux et les cobayes infectés de lèpre à la suite de la greffe de lépromes, qui réagissent à la réaction de Mitsuda (F. HAYASHI, *Intern. J. Leprosy*, 1933, 1, 31), se montrent sensibles à cette nouvelle réaction d'allergie même quand ils sont absolument indemnes de tuberculose. Il s'agit, dans ces cas, d'un phénomène de para-allergie bactérienne qui peut s'expliquer par les natures très voisines des bacilles lépreux et tuberculeux.

de cette nouvelle réaction est indiqué au cours des recherches de l'allergie dans la tuberculose et après vaccination par le BCG quand l'intradermo-réaction à 1 cg. de tuberculine brute s'est montrée négative.

CONCLUSIONS. — La nouvelle réaction d'allergie bactérienne spécifique dans la tuberculose, que nous venons de décrire, présente de grandes analogies avec le « phénomène de Koch ». Cette réaction démontre, chez l'organisme sensible, l'existence d'un certain degré de résistance à l'invasion bacillaire. Elle peut donc être considérée chez l'individu imprégné de tuberculose ou vacciné par le BCG comme l'indice d'un état de prémunition relative contre les surinfections tuberculeuses.

(Institut Pasteur. Service de la lèpre.)

PARA-ALLERGIES BACTÉRIENNES DANS LA TUBERCULOSE

par R. CHAUSSINAND.

Nous avons décrit récemment (1) une nouvelle réaction d'allergie bactérienne spécifique dans la tuberculose. Cette réaction est déterminée par l'injection intradermique d'un antigène à base de bacilles de Koch tués par la chaleur. Au cours de l'expérimentation, nous avons observé que les lépreux et les cobayes infectés de lèpre, réagissant à la réaction de Mitsuda (2), pouvaient également se montrer sensibles à cette nouvelle réaction, même quand ils se révélaient absolument indemnes de tuberculose (réaction de Mantoux à 1 cg. de tuberculine brute : négative). Ce phénomène de para-allergie dans la lèpre envers le bacille de Koch peut s'expliquer par les natures très voisines du bacille lépreux et du bacille tuberculeux.

Nous nous sommes alors demandé si le phénomène inverse existait, c'est-à-dire si la tuberculose et la vaccination par le BCG étaient également capables de provoquer des para-allergies bactériennes chez l'homme et chez le cobaye. Pour élucider cette question, nous avons préparé, d'après la technique utilisée pour l'antigène à bacille de Koch (1), différents antigènes à base de bacilles paratuberculeux. Les germes employés étaient soit des bacilles paratuberculeux saprophytes tels que le bacille de Timothée (bacille de la fiéole) et des bacilles paratuberculeux isolés chez des lépreux au cours d'essais de culture du bacille de Hansen (souches n° 10, n° 11, n° 31, n° 32 de notre collection), soit le bacille paratuberculeux pathogène souche Ton qui, inoculé à fortes doses, s'est montré virulent pour le cobaye et le lapin.

Ces six antigènes, expérimentés sur l'homme et sur le cobaye, nous ont permis de faire les constatations suivantes : L'homme et le cobaye

(1) R. CHAUSSINAND, *Ces Annales*, Soc. de Microbiologie, Mars 1947.

(2) F. HAYASHI, *Intern. J. Leprosy*, 1933, 4, 31.

non tuberculeux et non vaccinés par le BCG sont insensibles à l'injection intradermique de 0,1 cm³ de ces antigènes (0,1 mg. de bacilles morts). Par contre, l'homme et le cobaye tuberculeux ou vaccinés par le BCG présentent des réactions positives. L'intensité de ces réactions varie non seulement avec les divers antigènes utilisés, mais diffère encore suivant qu'il s'agit d'un organisme infecté de tuberculose ou d'un organisme vacciné par le BCG. Les antigènes préparés à partir de souches de bacilles paratuberculeux saprophytes donnent des réactions plus faibles que les antigènes à base de bacilles paratuberculeux pathogènes ou de bacilles de Koch et l'organisme infecté de tuberculose réagit, en général, plus fortement que l'organisme vacciné par le BCG. Cependant, l'homme et le cobaye vaccinés par le BCG peuvent se montrer sensibles aux antigènes à bacilles paratuberculeux bien qu'ils ne réagissent pas ou ne réagissent plus à l'intradermoréaction à 1 cg. de tuberculine brute (allergie déclinante). Il existe donc chez l'organisme tuberculeux ou vacciné par le BCG des para-allergies envers les germes paratuberculeux saprophytes et pathogènes.

Le bacille de Hansen pouvant être placé, au point de vue morphologique, comme le bacille de Koch, dans le genre *Mycobacterium*, il semblait fort probable qu'une para-allergie à l'égard de ce germe pût également se constater dans la tuberculose. L'expérimentation a confirmé cette hypothèse. En effet, l'injection de l'antigène de Mitsuda (suspension de lépromes chauffée à 100°) (2) ne donne aucune réaction chez l'homme et le cobaye indemnes de lèpre, non infectés de tuberculose et non vaccinés par le BCG, tandis que l'organisme non lépreux, mais infecté de tuberculose ou vacciné par le BCG réagit d'ordinaire plus ou moins fortement à l'antigène de Mitsuda. Nous avons noté, en outre, que l'homme et le cobaye non infectés de lèpre, vaccinés par le BCG pouvaient présenter des réactions de Mitsuda positives bien qu'ils ne réagissent pas ou ne réagissent plus à 1 cg. de tuberculine intradermique. Ces observations démontrent que l'organisme tuberculeux ou vacciné par le BCG a acquis la faculté de se défendre contre l'injection de bacilles de Hansen tués par la chaleur. Il existe donc également, dans la tuberculose et chez l'organisme vacciné par le BCG, un certain degré de para-allergie envers le germe de la lèpre.

CONCLUSIONS. — L'homme et le cobaye infectés de tuberculose ou vaccinés par le BCG réagissent non seulement à l'injection intradermique d'un antigène à base de bacilles de Koch tués par la chaleur, mais ils se montrent également sensibles à l'injection d'antigènes préparés de la même manière avec des bacilles paratuberculeux saprophytes ou pathogènes. La tuberculose et la vaccination par le BCG déterminent, en outre, une para-allergie bactérienne évidente à l'égard du bacille de la lèpre.

(Institut Pasteur. Service de la lèpre.)

ACTION DE LA PENICILLINE SUR LE BACILLE TUBERCULEUX HOMOGÈNE D'ARLOING-COURMONT

par P. BONÉT-MAURY et A. DEYSINE.

A partir d'un bacille tuberculeux virulent, d'origine humaine, S. Arloing et P. Courmont ont obtenu, par culture, la souche avirulente S.A.P.C. à croissance rapide et donnant des suspensions optiquement homogènes (1) qui se prêtent bien à l'enregistrement photométrique. On peut ainsi aborder, par cette technique (2), l'étude de l'action *in vitro* des antibiotiques sur le bacille tuberculeux (3).

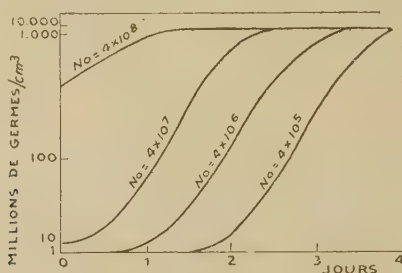


FIG. 1.

L'enregistrement de la croissance du bacille S.A.P.C. en eau peptonée glycinée (4) montre une multiplication régulière suivant une loi logarithmique; le temps de division est de l'ordre de six heures, c'est-à-dire qu'il faut environ vingt heures pour décupler la concentration bactérienne. L'évolution complète d'une culture à partir de quelques germes demande huit à dix jours, la concentration maximum atteinte étant de l'ordre de 5×10^{10} germes par centimètre cube. L'ensemencement avec des inoculats dilués successivement au 1/10 donne des courbes de croissance bien parallèles, traduisant une multiplication logarithmique dans un large domaine de la croissance (fig. 1).

Si l'on ajoute au milieu quelques unités de pénicilline par centimètre cube, on observe aucune modification des courbes de croissance, bien

(1) S. ARLOING et P. COURMONT, *C. R. Acad. Sci.*, 1898, **127**, 312.

(2) P. BONÉT-MAURY et R. WALÉN, *Ces Annales*, 1945, **71**, 284.

(3) Des résultats analogues, obtenus avec une technique différente, ont été publiés récemment par P. Courmont, à l'obligeance de qui nous devons cette souche. Ces deux séries de recherches ont été conduites de façon indépendante.

(4) Peptone Defresne, 10 gr.; NaCl, 5 gr.; glycérine, 40 gr.; eau pp. 1.000.

que des doses 100 fois plus faibles arrêtent la croissance des germes sensibles comme le staphylocoque.

Mais si l'on augmente la concentration en pénicilline, il apparaît une action de plus en plus marquée sur le bacille d'Arloing-Courmont (fig. 2). Avec 30 U. O. par centimètre cube, la croissance est déjà fortement retardée par rapport au témoin. Pour 100 U. O. par centimètre cube, après quelques bipartitions, la multiplication s'arrête pendant trois jours pour reprendre ensuite à un rythme ralenti. L'arrêt se prolonge pendant quatre jours avec 300 U. O. par centimètre cube et la multiplication reprend avec une vitesse faible. Enfin 1.000 U. O. stoppent la croissance des cultures pendant plus d'une semaine et la prolifération se trouve ensuite considérablement ralentie. Les repiquages sont cependant normaux et les examens (coloration au Ziehl et Fontana) montrent des germes d'aspect normal, sans formes de « souffrance ». Les concentrations bactériennes en fin d'expérience sont toutes à peu

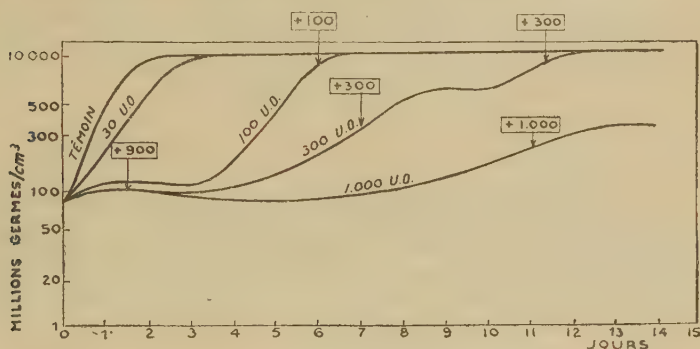


FIG. 2.

près égales à celle du témoin, sauf pour la suspension renfermant 1.000 U. O. qui n'atteint que 5 p. 100.

L'analyse de ces courbes permet de retrouver, bien que moins marquées, les différentes phases observées avec un germe très sensible comme le staphylocoque (5) [fig. 3] : 1° l'arrêt de la croissance après quelques divisions ; 2° une lyse partielle, très faible ici ; 3° une bactériostase de durée variable avec la concentration initiale en pénicilline ; 4° une reprise de la prolifération à un rythme altéré. La durée de la bactériostase est remarquable car, dans les conditions de l'expérience, la pénicilline est rapidement détruite, et, au bout de trois jours, il reste moins de 10 p. 100 de la quantité initiale (tableau I). Nous avons répété la même expérience en rajoutant de la pénicilline pendant l'enregistrement (fig. 4). Dans la suspension contenant à l'origine 300 unités, l'addition de la même quantité au cours de la prolifération post-lytique (septième jour) arrête celle-ci après quelques divisions ; la croissance reprend au bout de deux jours et une nouvelle addition de pénicilline

(5) P. BONÉT-MAURY et R. PÉRAULT, *Ces Annales*, 1946, 72, 136, et *Nature* 1945, 155, 701.

(onzième jour) ne paraît pas la ralentir. Avec une concentration originale de 1.000 unités, l'addition au deuxième jour de 900 unités allonge peu la bactériostase, mais le onzième jour l'apport de 1.000 unités ralentit nettement la prolifération. Les concentrations finales bactériennes sont alors inférieures au témoin : 44 p. 100 pour 100 unités, 48 p. 100 pour 300 unités et 1 p. 100 pour 1.000 unités. Les repiquages

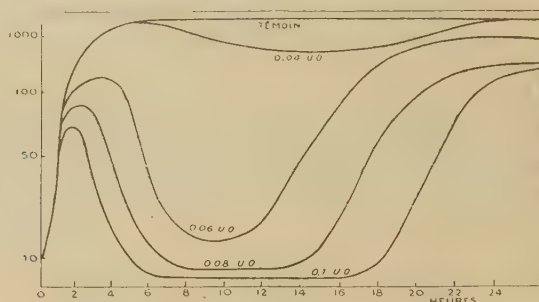


FIG. 3.

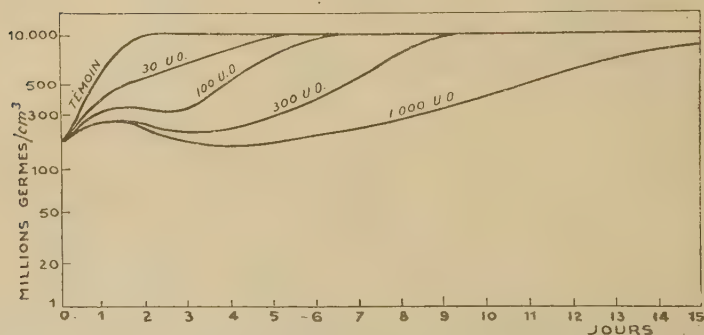


FIG. 4.

poussent normalement et, sur coloration, les germes n'apparaissent pas modifiés, sensiblement.

Pour préciser le mode d'action, nous avons mesuré parallèlement la respiration avec un respiromètre de Warburg.

TABLEAU I. — Destruction de la pénicilline à 37°.

A. — En milieu peptone glycérine.											
Jours	0	1	5	6	7	8	11	14	22	36	
Titre pénicilline.	100	90	80	60	52	47	42	34	5 à 10	3	
B. — Dans une suspension de BK (SAPC) à 10 ⁸ germes par centimètre-cube.											
Jours	0	1	2	3							
Titre pénicilline.	100	37	12,5	10							

Ralentie pour 30 U. O. par centimètre cube, la respiration paraît suspendue pendant la durée de la bactériostase pour les doses supérieures, notamment avec 1.000 U. O. Cet effet peut être dû soit à un arrêt du métabolisme respiratoire de la plupart des germes, soit plus vraisemblablement à la mort d'une fraction de la population, abaissant le quotient respiratoire au-dessous de la valeur mesurable avec cet appareil.

CONCLUSION. — La pénicilline à doses élevées est active sur le bacille tuberculeux homogène d'Arloing-Courmont et son action est du même type que celle observée sur le staphylocoque : arrêt de la prolifération après quelques divisions, faible autolyse et reprise de la croissance après une bactériostase de durée variable. De ces expériences avec une souche avirulente, modifiée par culture, on ne saurait conclure ni à une action identique sur un bacille virulent, ni surtout à une efficacité de la pénicilline *in vivo*. Mais, étant donné la toxicité très faible de la pénicilline purifiée (6) ces résultats justifient une expérimentation *in vivo* avec une souche virulente, mais avec des doses beaucoup plus élevées (au moins 100 fois) que celles utilisées jusqu'ici.

(Institut Alfred Fournier.)

SUR LE POUVOIR BACTÉRIOSTATIQUE POUR LE STAPHYLOCOQUE DORÉ DES ACIDES GRAS DE L'HUILE DE FOIE DE MORUE ET DE LEURS SAVONS

par J. SOLOMIDÈS et A. HIRSCH.

Malgré un nombre considérable de travaux sur le pouvoir germicide des savons et des acides gras, il n'existe que peu de travaux sur le pouvoir bactériostatique de ces corps. Cependant, dans ces dernières années, Baker, Harrison et Miller (1) ont montré que certains détergents anioniques, catégorie dans laquelle on classe d'habitude les savons, sont capables d'inhiber le développement du staphylocoque à des dilutions allant jusqu'à 1/30.000. Néanmoins, Walker et Sweeny (2), qui ont étudié le pouvoir bactériostatique des savons des acides gras de l'huile de chaulmoogra, ont montré que ces corps étaient entièrement dénués de pouvoir bactériostatique vis-à-vis d'un certain nombre de germes non acido-résistants, dont le staphylocoque. Poursuivant les recherches sur les principes bactériostatiques de l'huile de foie de morue et de son distillat que l'un de nous avait déjà amorcée (3), nous

(6) On a pu administrer récemment à l'homme 40 millions d'u. o. de pénicilline G quotidiennement.

(1) BAKER, HARRISON et MILLER, *J. exp. Med.*, 1941, 73, 249.

(2) WALKER et SWEENEY, *J. inf. Dis.*, 1920, 26, 238.

(3) J. SOLOMIDÈS, *C. R. Soc. Biol.*, 1946, 140, 111, 837 et 839; *Rev. Tub.*, 1946, 40, 314; *Soc. d'Etudes Scient. sur la Tuberc.*, séance du 14 Décembre 1946, in *Rev. Tub.*, 1946, 40, 807.

avons observé que le staphylocoque se développait mal dans le bouillon ordinaire en présence de faibles quantités de savons d'acides gras de l'huile de foie de morue. L'inhibition du développement de ce germe était même parfois complète à des taux de dilution de l'ordre de 1/9.000 après dix-huit heures d'étuve, si les dilutions étaient faites à partir d'une solution alcoolique d'acides gras. Cette observation nous a amené à penser que la présence d'alcool pourrait être nécessaire à l'activité bactériostatique des acides gras de l'huile de foie de morue et de leurs savons. Nous avons donc entrepris l'étude de l'action de l'alcool sur le pouvoir bactériostatique de ces corps et effectué, à cet effet, les expériences suivantes :

Après avoir réparti du bouillon ordinaire dans des tubes à essai, à raison de 9 cm³ par tube, nous introduisons dans chaque tube une certaine quantité d'alcool, toujours la même, puis, après agitation, on y fait des dilutions successives en partant d'une solution aqueuse de savon. Dans la série témoin, on fait les mêmes dilutions sans addition préalable d'alcool. Au bout de seize à dix-huit heures à l'étuve à 38°, on observe que dans la série alcoolisée, l'inhibition du développement du staphylocoque peut être obtenue, suivant les cas, à des dilutions allant de 1/90.000 à 1/9.000.000, alors que dans la série non alcoolisée, comme dans les tubes témoins alcoolisés mais ne contenant pas de savon, le développement se fait partout sans exception.

On obtient à peu près les mêmes résultats en remplaçant l'alcool par l'acétone. La quantité optima d'alcool ou d'acétone compatible avec un bon développement du staphylocoque, au bout de dix-huit heures, peut varier entre 0,2 et 0,3 cm³ pour 9 cm³ de bouillon. En effet, nous avons observé que certains bouillons, en général très foncés, permettent un bon développement du staphylocoque à des concentrations de 1/30 d'alcool, alors que d'autres bouillons, en général plus clairs, exigent des quantités d'alcool plus faibles (0,2 cm³ pour 9 cm³ de bouillon, ce qui fait une concentration 1/45 d'alcool). Ces variations de la qualité des bouillons employés semblent dépendre de la qualité de la viande dont ils dérivent.

En opérant toujours en présence d'alcool, nous avons étudié un certain nombre d'autres facteurs pouvant influencer sur le pouvoir bactériostatique de nos solutions savonneuses.

1° *Quantité de l'inoculum.* — Nous avons fait des titrages d'une même solution savonneuse en ensemençant avec une culture de staphylocoque en bouillon, âgée de vingt-quatre heures, et avec ses dilutions dans le bouillon à 1/10, 1/50 et 1/100. Tous les ensemençements ont été effectués, dans chaque cas, avec un fil de fer, toujours le même. Avec la culture de vingt-quatre heures, les résultats ont été peu nets. En effet, on observe, dans ce cas, dans le délai habituel de dix-huit heures, un léger développement du staphylocoque, même à des concentrations relativement faibles (1/9.000 et 1/90.000). Les résultats sont déjà meilleurs avec la culture de staphylocoque diluée à 1/10 et optima avec les dilutions à 1/50 et 1/100 de la même culture. Les résultats sont à peu près identiques dans ces deux derniers cas.

2° *Milieu de culture.* — Une même solution savonneuse a été titrée en eau peptonée alcoolisée, d'une part, et en bouillon alcoolisé, dans les mêmes conditions, d'autre part. Les résultats ont été toujours nuls

pour l'eau peptonée alcoolisée, même à des dilutions inférieures à 1/9.000, alors que le même staphylocoque provenant de la même culture et ensemencé de la même façon était inhibé à des dilutions considérables allant jusqu'à 1/90.000 ou 1/900.000 dans le bouillon alcoolisé.

3° *Chaleur.* — La chaleur modérée (100° au bain-marie pendant une demi-heure) ne semble pas détruire le pouvoir bactériostatique des acides gras originels ou de leurs solutions savonneuses et alcalines de pH 9.

4° *Réaction des solutions savonneuses.* — Toutes les expériences que nous venons de décrire ont été réalisées avec des solutions savonneuses alcalines. Nous nous sommes vite aperçus que les résultats variaient avec la quantité de soude ajoutée pour transformer les acides gras en savons. Nous avons donc préparé une série de tubes contenant 9 cm³ d'eau plus ou moins alcaline ; après chauffage à 100°, chacun des tubes reçoit 1 cm³ d'acides gras et, après agitation, afin d'obtenir une émulsion homogène, on procède, après refroidissement, à leur titrage respectif en bouillon ordinaire alcoolisé. Les résultats obtenus nous ont montré que la préparation la plus active correspond à la solution dont le pH est égal à 9. Les résultats sont franchement plus mauvais pour les émulsions de pH égal à 10 et nuls pour les solutions de pH supérieurs. Les émulsions savonneuses de pH égal à 7,4 se sont montrées 10 fois moins actives que les préparations de pH égal à 9.

5° *Dilution.* — Les émulsions alcalines contenant des acides gras au 1/10 se sont toujours montrées plus actives que les solutions plus diluées. A partir d'une émulsion alcaline à 1/10 d'acides gras et de pH environ 9, on fait deux dilutions à 1/900, l'une dans l'eau, l'autre dans le bouillon. On a ainsi une solution savonneuse concentrée à 1/10 et deux solutions 90 fois plus diluées. Si vingt-quatre heures après on procède à leur titrage respectif, en bouillon ordinaire alcoolisé, on observe que l'émulsion la plus concentrée (à 1/10) se montre bactériostatique à des dilutions beaucoup plus considérables que l'émulsion dans le bouillon à 1/900 et qu'à son tour, cette dernière émulsion dans le bouillon est beaucoup plus active que l'émulsion dans l'eau de même titre (1/900).

Dans une autre série d'expériences, en partant d'une émulsion savonneuse au 1/10, nous avons effectué des dilutions successives dans le bouillon alcoolisé, aussi rapidement que possible, puis quinze minutes après, une fois que tous les tubes sauf le premier à 1/900 étaient ensemencés, nous faisons un deuxième titrage en effectuant les mêmes dilutions à partir du premier tube du titrage précédent qui n'avait pas été ensemencé. Les résultats ont été constamment environ 10 fois supérieurs dans le premier cas que dans le second où les dilutions ont été réalisées avec un certain retard (quinze minutes environ) à partir de la même émulsion à 1/900. Ainsi donc, le pouvoir bactériostatique d'une émulsion concentrée varie rapidement en concentration 90 fois plus faible.

6° *Stabilité des émulsions savonneuses et des acides gras.* — Nous avons constaté que les vieilles émulsions savonneuses perdent progressivement beaucoup de leur pouvoir bactériostatique. A des pH égaux à 10, la perte du pouvoir bactériostatique de ces émulsions peut être complète en un mois. A des pH inférieurs, cette diminution d'activité

semble beaucoup plus lente et quelques-unes de nos émulsions âgées de plus d'un mois se montrent encore actives à des dilutions voisines de 1/100.000.

La même instabilité a été observée avec les acides gras de l'huile de foie de morue. Les émulsions préparées dans les conditions de pH optima déjà indiquées, à partir d'acides gras fraîchement préparés, se montrent toujours plus actives que les émulsions préparées dans les mêmes conditions à partir d'acides gras âgés de quatre à cinq jours. Ce n'est qu'en partant d'acides gras fraîchement préparés qu'on peut obtenir des émulsions savonneuses de pH égal à 9 dont les titrages effectués dans les conditions optima sur lesquelles nous venons d'insister, montrent une inhibition du développement du staphylocoque doré à des dilutions allant de 1/900.000 à 1/9.000.000. Trois souches de *Staphylococcus aureus* ont été essayées sans variation appréciable des résultats.

CONCLUSIONS. — En présence d'alcool ou d'acétone, les solutions savonneuses des acides gras de l'huile de foie de morue possèdent un pouvoir bactériostatique considérable, à condition d'opérer dans du bouillon ordinaire.

En eau peptonée alcoolisée, ces préparations perdent la plus grande partie de leur pouvoir bactériostatique vis-à-vis du staphylocoque doré.

Elles présentent leur maximum d'activité à certains pH qu'on peut situer aux environs de 9 pour des concentrations égales à 1/10 d'acides gras dans l'eau alcaline.

Par dilution dans l'eau distillée, elles perdent rapidement leur pouvoir bactériostatique. Par dilution dans le bouillon, cette perte est beaucoup moins considérable.

Maintenues à la température du laboratoire, elles perdent progressivement leur pouvoir bactériostatique. Il en est de même pour les acides gras originels.

En opérant dans les meilleures conditions possibles, les taux de dilution actifs contre le staphylocoque doré varient entre 1/900.000 et 1/9.000.000.

(Institut Pasteur et Laboratoire des Corps gras de Bellevue.)

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU VIRUS DE LA LYMPHOGRANULOMATOSE INGUINALE

par P. LÉPINE, J. GIUNTINI, O. CROISSANT et L. REINIÉ.

La spécificité des granulo-corps, décrits en 1936 par Miyagawa et ses collaborateurs dans la maladie de Nicolas et Favre, est aujourd'hui amplement démontrée et universellement admise. L'isolement par différentes méthodes d'extraction de ces granulo-corps et la démonstration de leur virulence, leur culture dans le sac vitellin de l'œuf de poule incubé, nous donnent, entre autres arguments, la preuve que nous

avons bien affaire au virus causal de la lymphogranulomatose inguinale.

Le fait que ces corpuscules soient colorables par différentes méthodes a donné lieu à de nombreuses études morphologiques sans que leur nature puisse être définitivement élucidée. D'autre part, l'étude des réactions histochimiques de ces mêmes corps laisse entrevoir une organisation complexe.

Aussi était-il particulièrement intéressant de soumettre ces corpuscules à l'examen du microscope électronique. Nos expériences ont porté sur la souche Rake (1) du virus de la lymphogranulomatose inguinale, cultivé et entreteenu dans le sac vitellin de l'œuf de poule. A chaque passage, la virulence de la culture est appréciée et contrôlée par inoculation intracérébrale à la souris. Les corpuscules ont été extraits sui-

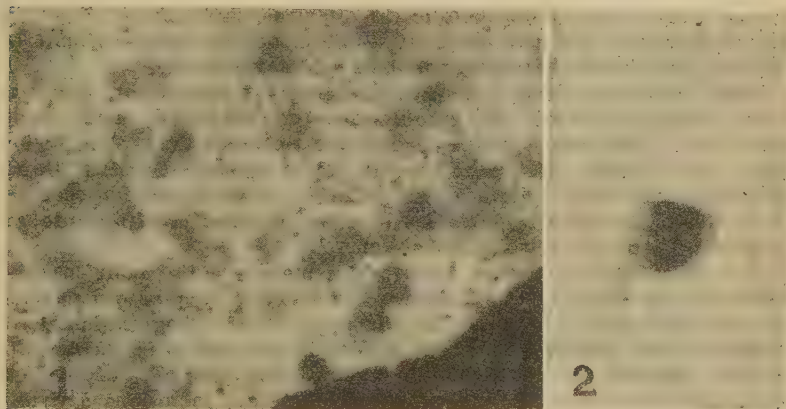


FIG. 1. — Corpuscules du virus de la lymphogranulomatose inguinale.

FIG. 2. — Rickettsie du typhus exanthématique.

Pour les deux figures, grossissement 20,000, tension 50 kv
(microscope C. S. F. à lentilles électrostatiques).

vant la méthode de Smadel (2) pour l'extraction des corpuscules de la psittacose par centrifugation fractionnée à basse température. Nous avons ainsi obtenu des suspensions renfermant à peu près exclusivement des granulo-corps (colorables par la méthode de Morosow ou par celle décrite par l'un de nous avec M^{lle} Sautter [3]), suspensions utilisées en vue d'essais qui sont rapportés ailleurs.

Un prélèvement fait sur une suspension conservée depuis quatre-vingt-dix jours à la glacière a été dilué à un taux convenable et photographié au microscope électronique (microscope à lentilles électrostatiques C.S.F., tension 50 kv). Sur les clichés obtenus, on remarque :

- (1) Due à l'obligeance du Dr Jos. E. Smadel que nous tenons à remercier.
- (2) JOS. E. SMADEL, K. WERTMAN and Reginald L. REAGAN, *Proceed Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1943, 54, 70.
- (3) P. LÉPINE et V. SAUTTER, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, 135, 1001.

1° La présence en grand nombre de formations correspondant aux granulo-corps de Miyagawa ;

2° L'existence de particules plus petites qui sont vraisemblablement des fragments provenant de l'autolyse ou de la désintégration des corpuscules ;

3° Les corpuscules présentent une morphologie définie très nettement différente de celle obtenue jusqu'ici pour la plupart des virus. On reconnaît à l'intérieur de la particule des zones de condensation nettement délimitées et définissables, analogues aux organites rencontrés dans les éléments cellulaires d'organismes plus élevés en organisation. D'autre part, les images ne laissent aucun doute quant à la présence d'une membrane limitante aisément reconnaissable sur certains des spécimens. Le tout évoque une cellule bien individualisée.

Nous avons donc affaire, dans le cas du virus de Nicolas et Favre, à une organisation déjà très élevée et d'une structure complexe dont la morphologie rappelle singulièrement celle des rickettsies.

A titre de comparaison, à côté de la figure 1 représentant, avec un grossissement de 20.000, les granulo-corps de Miyagawa, nous montrons (fig. 2), au même grossissement, une rickettsie du typhus historique dont l'image a été prise avec le même appareil à partir d'une suspension virulente obligeamment mise à notre disposition par le Dr P. Giroud. L'analogie entre les deux organismes est frappante et ne peut manquer de retenir l'attention.

Ces aspects sont de nature à étayer l'hypothèse émise pour la première fois par Mauro (4) de la nature rickettsienne ou plus exactement pararickettsienne (C. Levaditi) du virus de la lymphogranulomatose inguinale, idée reprise depuis par différents auteurs et en faveur de laquelle militent des arguments comme ceux que P. Lépine et V. Sautter (5) ont tiré de l'étude histochemique des inclusions à virus, démontrant la présence en grandes quantités d'acide thymonucléique dans les corps de Miyagawa de la lymphogranulomatose, comme dans les corps de Levinthal de la psittacose dans des conditions qui rapprochaient étroitement ces structures des rickettsies du typhus exanthématique.

(Service des Virus, Institut Pasteur.)

ÉVOLUTION DES LÉSIONS HISTOLOGIQUES ET DES ANTICORPS RABICIDES AUX COURS DE L'INCUBATION DE LA RAGE DES RUES

par P. LÉPINE et P. ATHANASIU.

Le moment d'apparition des premières lésions histologiques au cours de l'incubation de la rage présente un grand intérêt non seulement théorique, mais encore pratique. S'il pouvait être démontré, en effet,

(4) MAURO, *Soc. Int. Microbiol.*, 1937, 9, 339.

(5) P. LÉPINE et V. SAUTTER, *Ces Annales*, 1946, 72, 174.

que les premières lésions cérébrales sont antérieures au moment où la salive devient virulente, il serait possible d'exempter du traitement antirabique des personnes mordues par un animal ne présentant pas de symptômes de rage et décédé avant l'expiration de la période d'observation. Du point de vue théorique, d'autre part, il est intéressant de chercher s'il existe, au moins dans le temps, une relation entre la présence des lésions cellulaires et celle des anticorps sériques dont le moment d'apparition a fait l'objet de recherches antérieures [Lépine et Sautter] (1).

Nous avons, dans ce but, inoculé par voie intracérébrale 14 lapins avec une souche de rage des rues [souche Corse I] (*) dont l'évolution chez le lapin est régulièrement supérieure à dix-huit jours et de vingt jours en moyenne. A partir de la quarante-huitième heure de l'inoculation, nous avons sacrifié un lapin tous les deux jours, puis tous les jours du seizième au vingtième jour. L'encéphale, les deux ganglions de Gasser et 1,5 cm. du tronc principal du sciatique ont été prélevés sur chaque animal pour être soumis à l'examen histologique en vue de la recherche des lésions et inoculés à des souris (4 souris chaque fois) pour la mise en évidence du virus. En outre, avant d'être sacrifié, l'animal était saigné, son sérum recueilli pour être titré en présence de suspensions de virus de la même souche des rues en vue de la recherche des anticorps neutralisants, suivant la technique en usage au laboratoire.

Les résultats peuvent être résumés ainsi :

1° Dans le cerveau, on constate, dès le quatrième jour, une dilatation vasculaire généralisée suivie, le sixième jour, d'une diapédèse des cellules mobiles du sang. Le huitième jour, on trouve une légère infiltration diffuse dans la région moyenne de la corne d'Ammon ; les premiers foyers de neuronophagie apparaissent dans la corne d'Ammon et au niveau du noyau optique où l'on trouve, en outre, des cellules tigroïdes. Dans le noyau optique, on observe déjà de petits corps de Negri, nombreux et faiblement colorables. Le dixième jour, les phénomènes inflammatoires de diapédèse et les réactions cellulaires sont importants et le diagnostic de rage est évident. A partir du douzième jour, les corps de Negri, nombreux dans la corne d'Ammon, sont bien colorés et présentent leur aspect typique. Au seizième jour, la méningite et l'encéphalite sont très accusées ; il y a formation de manchons périvasculaires ; les premiers symptômes cliniques apparaissent chez l'animal (hyperthermie, dilatation pupillaire). A partir du dix-septième jour, il n'y a pratiquement plus de variations dans les lésions qui ont atteint leur intensité maxima.

Les passages à la souris, qui sont négatifs le sixième jour, sont tous positifs avec l'encéphale le huitième jour et le demeurent constamment

(1) P. LÉPINE et V. SAUTTER, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 167.

(*) Souche due à l'obligeance de M. Ottavi, vétérinaire départemental de la Corse, à qui nous adressons tous nos remerciements. La description complète des caractères de cette souche et le détail des recherches rapportées ici feront l'objet d'un travail d'ensemble qui sera publié ailleurs. La virulence limite de cette souche au taux de 100 p. 100 d'infection chez le lapin est constituée par l'inoculation intracérébrale de 0,25 cm³ d'une émulsion d'encéphale au millième.

par la suite, le taux de virus augmentant jusqu'au quatorzième jour.

2° *Ganglions de Gasser.* — Les premières traces d'infiltration apparaissent le huitième jour sous forme d'une infiltration légère, sans présence de corps de Negri. L'infiltration se précise le dixième jour. Les premiers corps de Negri, rares et pâles, apparaissent le douzième jour. Ils sont encore rares mais mieux précisés le quatorzième jour. A partir du seizième jour, les lésions sont typiques mais, par la suite, le nombre des corps de Negri va en augmentant régulièrement jusqu'au trente-deuxième jour (survie maxima de l'un des témoins). Les ganglions de Gasser ne se montrent virulents que le dixième jour, ce qui cadre avec les lésions rencontrées. Par contre, nos expériences font apparaître une constatation inattendue. Le vingtième jour, les ganglions de Gasser ne renferment plus de virus (4 souris négatives chez 1 animal), ou bien ils n'en renferment que très peu (1 souris positive sur 4 chez l'autre) ; le trente-deuxième jour, il y a, de même, absence de virulence des ganglions de Gasser.

3° *Dans le nerf sciatique*, la première apparition des cellules d'infiltration se produit le dixième jour de l'incubation. Cette infiltration, qui demeure légère, forme, le dix-septième jour, quelques foyers limités autour des vaisseaux de la gaine neurale ou dans le nerf lui-même. La virulence du sciatique apparaît le douzième jour, mais, comme pour les ganglions de Gasser, on assiste à un phénomène paradoxal de diminution, puis de disparition de la virulence au fur et à mesure de l'évolution de la rage (dix-huitième jour, 3 souris positives sur 4 ; dix-neuvième jour, 1 sur 4 ; vingtième jour, 1 sur 4 et 0 sur 4 ; trente-deuxième jour, 1 sur 4).

4° *Anticorps sériques.* — Les recherches antérieures avaient montré que dans la rage à virus fixe et dans la vaccination antirabique les premiers anticorps sériques peuvent être mis en évidence le dixième jour. Dans nos expériences, le sérum des lapins a été essayé avec les résultats suivants :

a) en employant 0,5 cm³ de sérum pour neutraliser une quantité égale de la même souche de virus à 1/200, renfermant 10 d. m. m., le sérum du dixième jour montre une action déjà manifeste puisque l'incubation de la rage chez le lapin est portée à trente-huit jours. Le taux d'anticorps va en augmentant les jours suivants pour devenir complètement neutralisant à partir du quatorzième jour. Tous les sérums prélevés à cette date et au delà protègent le lapin à ces doses.

b) en employant 0,2 cm³ de sérum pour neutraliser 0,5 cm³ de virus à 1/200, seuls les sérums des dix-huitième, dix-neuvième et vingtième jours protègent complètement le lapin contre l'infection rabique.

Il faut en retenir que les anticorps apparus dès le dixième jour vont en augmentant régulièrement jusqu'au moment de la mort, de sorte que l'animal atteint de paralysie généralisée en renferme dans son sérum des quantités énormes puisque chaque centimètre cube de son sérum contient au minimum les anticorps suffisants pour neutraliser 44 doses létales minima.

CONCLUSION. — Au cours de l'incubation de la rage chez le lapin, dont l'évolution dure de dix-huit à vingt jours à la suite de l'inoculation intracérébrale, les premières lésions cérébrales apparaissent vers le

quatrième jour, alors que le cerveau n'est virulent qu'au huitième jour et que la mort ne surviendra chez les premiers animaux que le dix-huitième jour. Les ganglions de Gasser présentent des lésions le huitième jour et sont virulents le dixième. Le sciatique présente des lésions le dixième jour, il est virulent le douzième, mais, alors que le virus persiste dans le cerveau jusqu'au moment de la mort, on observe dans les ganglions de Gasser et dans le sciatique une diminution, voire une disparition complète, de la virulence à partir du dix-huitième jour.

Enfin, les anticorps sériques qui apparaissent dans le sérum à partir du dixième jour vont en augmentant régulièrement jusqu'au moment de la mort de l'animal, pour atteindre des taux très élevés.

Nous discuterons dans un autre travail les conclusions à tirer de ces constatations.

(Service des Virus, Institut Pasteur.)

CONTAMINATION SPONTANÉE DU LAPIN PAR LE VIRUS DE LA MALADIE DE BORNA

par P. LÉPINE et P. ATHANASIU.

Au cours d'expériences sur la rage avec la souche Corse I, le lapin L. 436 est inoculé avec le cerveau du lapin L. 418 mort de rage, pour servir de témoin à une expérience ; il est sacrifié paralysé, le dix-huitième jour (symptômes et lésions de rage typiques). Son cerveau est inoculé le 8 Octobre 1946 à des taux différents à 8 lapins pour titrer le virus. 7 lapins survivent ; le huitième, le n° 465 L., qui avait reçu une émulsion à 1/3.000 du lapin L. 436, présente une maladie débutant le vingtième jour par de l'amaigrissement et se terminant le quarantième jour (18 Novembre) par la mort. L'examen histologique du névraxe montre une méningite légère, et, dans la corne d'Ammon, la présence de nombreuses formations intranucléaires du type Joest-Degen. Absence de corps de Negri. En bref, lésions non de la rage mais de la maladie de Borna.

Le passage du lapin 465 L. à d'autres lapins a reproduit de façon typique le tableau de la maladie de Borna avec mort en trente-quatre jours. Il y a donc eu, de toute évidence, substitution au virus rabique du virus de la maladie de Borna. Pourtant, le lapin 436 L. présentait des lésions typiques de la rage des rues et le passage de son cerveau à des souris a déterminé, chez ces dernières, une rage authentique avec corps de Negri.

Or, au moment des expériences, on ne travaillait pas habituellement le virus de la maladie de Borna dans le laboratoire. La seule origine possible de la contagion réside dans un passage ordinaire d'entretien du virus de Borna qui avait eu lieu le 13 Septembre, soit près d'un mois avant, par inoculation intracérébrale à un lapin n° 451 L., lequel a succombé le 16 Octobre (trente-quatrième jour). Pendant huit jours (du 8 au 16 Octobre), le lapin atteint de maladie de Borna et le lapin

inoculé de la rage se sont trouvés cohabiter dans la même écurie, mais à distance et sans aucun contact direct.

Comme il est invraisemblable que le virus de Borna soit venu de l'extérieur, et que toute possibilité de transmission par les instruments d'inoculation se trouve éliminée par les conditions mêmes du travail, cette cohabitation sans contact de huit jours peut seule expliquer la transmission de la maladie de Borna.

On n'a pas encore signalé dans la littérature de cas spontanés de maladie de Borna sur des animaux de laboratoire vivant en cage. On ignore du reste le mode de contamination naturel des chevaux. Nicolau et Galloway ont réussi à déclencher la maladie chez des lapins sains cohabitant étroitement avec des lapins malades en leur faisant une injection d'eau physiologique dans le cerveau. La possibilité d'une infection latente est ainsi démontrée.

Il est probable que dans le cas de notre lapin 436 l'infection a eu lieu au cours des huit jours de présence simultanée du lapin atteint de maladie de Borna et de celui chez lequel l'infection s'est développée spontanément, l'éclosion névrauxique étant facilitée par l'injection préalable de virus rabique dilué à un taux non pathogène. Comment la contamination s'est-elle opérée ? Il est impossible de le dire, mais, étant donné que les animaux n'étaient pas en contact immédiat, l'éventualité d'une transmission indirecte du virus par des mouches ou par un insecte piqueur ne peut être rejetée.

Notons, enfin, que comme nous opérons avec une souche de rage à évolution lente, les symptômes présentés par le lapin atteint de maladie de Borna auraient pu facilement passer pour de la rage et la nature de l'affection méconnue, si nous n'avions fait comme toujours un strict contrôle histopathologique de l'encéphale de tous les animaux inoculés.

(Service des Virus, Institut Pasteur.)

DESTRUCTION DES TOXINES BACTERIENNES PAR LES PROTEASES MICROBIENNES

par R. LEGROUX, C. JÉRAMEC et L. SECOND.

Les travaux de Ramon et Richou sur l'action de la subtiline nous incitent à relater des faits recueillis, il y a quelques années, au cours de la préparation des toxines tétanique et botulique.

Nous utilisons pour obtenir la toxine tétanique un bouillon de culture qui avait été amélioré par l'adjonction de poudre de globules rouges cuits, desséchés, puis broyés au moulin (1). Dans ce milieu le maximum de toxicité était obtenu le douzième jour de la culture à 37°. Il arrivait parfois entre le cinquième et sixième jour de la culture de voir apparaître un trouble épais, et, en quelques heures, toute

(1) LEGROUX et RAMON, *Soc. Biol.*, 1933, **113**, 861 ; C. JÉRAMEC, *Rev. Imm.*, 1936, **2**, 209.

toxicité disparaissait du milieu. Nous nous sommes rendu compte que ce trouble était dû à une contamination du bouillon tétanique par une bactérie aérobie, colorable par la méthode de Gram, sporulée, du type *Bac. anthracoides*. Il nous a été difficile d'isoler cette bactérie surajoutée car, après son séjour dans le milieu tétanique elle s'auto-lysait sur les milieux neufs ; nous avons réussi sa culture, séparée de son principe lytique, par ensemencement en gélose-gélatine profonde, où, du reste, ces colonies présentaient le type de celles du bacille tétanique. Cette contamination provenait de la poudre de globules rouges utilisée où les spores du bacille aérobie, enrobées dans l'albumine globulaire desséchée, résistaient à la stérilisation du bouillon. C'était seulement vers le cinquième jour du développement du bacille tétanique, au moment où les protéases élaborées par lui digéraient les albumines du sang, que la spore libérée pouvait germer. Mais après quelques heures de développement ce bacille aérobie, lui-même protéolytique, avait complètement dissocié, rompu, la chaîne moléculaire qui constitue la toxine tétanique.

Le bacille tétanique peut aussi détruire la toxine qu'il élabore au cours de son développement dans les milieux ; on sait que suivant la composition du bouillon le maximum de toxicité se situe entre le sixième, huitième, ou quinzième jour, mais si on prolonge la culture au-delà du maximum de toxicité celle-ci s'atténue très rapidement et disparaît. La toxine est, ici encore, dissociée par les protéases du bacille qui l'a engendrée.

La symbiose de toutes les bactéries avec le bacille tétanique n'engendre pas forcément la diminution de toxicité ; le degré ou la rapidité de destruction semble dépendre du pouvoir protéolytique : au cours de nos préparations, si la contamination était due à un staphylocoque, la toxine s'atténuait plus lentement qu'avec le bacille anthracoides et par contre, si la contamination était due à une bactérie non protéolytique, *Bac. cutis commune*, le titre toxique était alors plus élevé qu'en culture normale. De semblables faits ont été signalés jadis par Metchnikoff (2).

L'atténuation ou la destruction de toxine dans les milieux de production variera dans le temps en fonction de la composition du milieu et du taux d'élaboration des protéases. Nous avons observé ce fait dans la préparation des toxines botuliques : la culture dans un milieu déterminé donne le maximum de toxicité entre le cinquième et sixième jour, et la toxine s'atténue ensuite très rapidement ; si un changement du milieu intervient, soit équilibre ionique différent, — pH 5,6 au départ au lieu de pH 7,5 — soit par l'utilisation d'une peptone plus dégradée, la toxicité maxima du bouillon surviendra du onzième au douzième jour après l'ensemencement. Or, dans l'un ou l'autre cas, si nous attendons quarante-huit heures ou même seulement vingt-quatre heures après l'obtention maxima de toxine, nous observons une diminution de la toxicité qui peut être considérable. Là encore la seule protéase botulique agit au moment de son élaboration qui suit le déséquilibre chimique du milieu que nous appelons « la toxine ».

L'action *in vitro* de filtrat de culture microbienne, bactéries ou champignons, diminue le pouvoir pathogène des toxines ; nous pensons que

(2) METCHNIKOFF, Ces Annales, 1897, 11, 802.

cette activité est liée aux enzymes protéolytiques élaborés. Une altération parallèle des toxines pourrait être recherchée et titrée par l'étude des attaques tryptiques ou papaïniques.

(Institut Pasteur.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etude morphologique et cytologique de plusieurs souches de « *Penicillium notatum* » Westling, par M^{lle} B. DELAPORTE et M. A. SACCAS.

Une bactérie productrice de fructosane dans la betterave gelée, par M^{lle} Berthe DELAPORTE et M. Henri BELVAL.

Sur l'utilisation de l'azote nitrique par les bactéries du genre « *Bacillus* », par MM. LEMOIGNE, R. GAVARD, M^{me} B. CROSON et M^{lle} LE TREIS (ce numéro, p. 725).

Dix années de traitement antirabique à l'Institut Pasteur de l'Iran, par M. GHODSI.

Séance du 3 avril 1947.

Présidence de M. GASTINEL.

COMMUNICATIONS

TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES ENTÉROTOXIQUES

par RENÉ BUTTIAUX et RAYMONDE BROGNIART.

On sait l'importance du rôle des staphylocoques entérottoxiques dans les intoxications alimentaires. Les auteurs Anglo-Saxons l'ont bien mise en évidence. Nous en avons rapporté quelques cas (1, 2) survenus dans la région du nord de la France.

(1) R. BUTTIAUX, M. GERVOIS et D. LIÉGEOIS, *Société de Gastro-entérologie Lille*, mars 1946, *Arch. Mal. App. Dig.*, 1946, 36, 90.

(2) R. BUTTIAUX et L. LESNÉ, *Le lait*, 1947, 27, 121.

L'isolement du staphylocoque est souvent difficile dans les produits alimentaires ou dans les selles des malades. Son développement sur les milieux de culture est entravé par l'abondance des germes saprophytes.

A la suite des travaux de Koch (3), Chapman a mis au point des milieux électifs qui permettent le développement facile du staphylocoque à l'exclusion presque complète des autres germes (4, 5). Tous sont basés sur la résistance des staphylocoques à des concentrations en ClNa de 75 g. p. 1.000. Dans ces solutions fortement hypertoniques il est peu d'autres microbes qui soient encore capables de cultiver.

Nous utilisons fréquemment ces milieux avec le plus grand succès. Voici la technique de Chapman et les modifications que nous y avons apportées.

I. ISOLEMENT DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES. — La recherche des staphylocoques pathogènes dans les aliments suspects ou dans les feces se fait en trois temps.

1. Enrichissement. — Nous portons une dilution très épaisse de selles (1 à 2 g. dans 10 cm³ d'eau distillée) ou du produit alimentaire suspect finement broyé dans 10 cm³ d'eau distillée ou 10 cm³ du lait à étudier dans un grand tube à essai contenant 10 cm³ du milieu suivant :

Nutrient broth	16 g. (Difco) (6).
Protéose peptone, n° 3	40 g. (Difco).
ClNa	150 g.
Lactose	15 g.
Bactoagar	1 g.

que l'on dissout dans 1.000 cm³ d'eau distillée à pH 7. Le pH final doit être de 7,4. Après répartition du milieu, on stérilise à l'autoclave à 120° pendant vingt minutes.

La concentration finale du milieu ensemencé est donc de 75 g. de ClNa p. 1.000. On porte à l'étuve à 37° durant trente-six heures. Dans ces conditions, le staphylocoque, même s'il est en très petite quantité dans le produit incriminé, se développe très abondamment et pratiquement est le seul à se développer.

2. Isolement. — Nous employons le milieu de Chapman mannité dont voici la formule :

Nutrient broth	8 g. (Difco).
Protéose peptone, n° 3	9 g. (Difco).
NaCl	75 g.
Mannite	10 g.
Bactoagar	15 g.
Rouge de phénol	0 g. 025

(3) F. E. KOCH, *Zentralbl. Bakt.*, 1942, **449**, 122.

(4) G. H. CHAPMAN, *J. Bact.*, 1945, **50**, 201.

(5) G. H. CHAPMAN, *J. Bact.*, 1946, **51**, 405.

(6) 8 grammes de Nutrient broth peuvent être remplacés par :

Extrait de viande de bœuf	3 g.
Bonne peptone tryptique	5 g.

La protéose peptone n° 3 Difco n'est pas indispensable, mais les résultats sont beaucoup moins bons avec les peptones françaises actuelles.

Dissoudre en chauffant dans 1.000 cm³ d'eau distillée à pH 7. Amener à pH 7,4. Répartir en gros tubes à essai (20 cm³ de milieu par tube). Stériliser à l'autoclave à 120° pendant trente minutes. Au moment de l'emploi couler en boîtes de Petri.

I goutte du milieu d'enrichissement est reportée sur une boîte de Petri contenant le milieu hypertonique mannite. Elle y est étalée, on porte à l'étuve à 37° durant quarante-huit heures.

Les colonies de staphylocoque pathogène sont grosses et entourées d'une auréole jaunâtre due à la fermentation de la mannite ; leur pigmentation propre est très nettement visible. Les staphylocoques supposés non pathogènes, ne fermentant pas la mannite, fournissent de petites colonies rosées.

Sur ce milieu le staphylocoque se développe presque à l'état pur. Nous n'avons constaté de temps en temps que le développement de quelques bacilles diptérimorphes ou de quelques rares bacilles anthracoides. Les bacilles Gram négatifs n'y cultivent jamais. Pour la recherche des staphylocoques pathogènes dans les selles, il suffira souvent d'ensemencer directement sur le milieu de Chapman mannité coulé en boîte de Pétri, V à VI gouttes d'une dilution épaisse de fèces en eau peptonée (1 à 2 g. pour 10 cm³ d'eau peptonée) ; on obtiendra d'emblée une culture pratiquement pure de staphylocoque.

3. Repiquage. — Les colonies de staphylocoques fermentant la mannite sont alors repiquées sur le milieu de Chapman suivant :

Nutrient broth.	8 g. (Difco).
Protéose peptone.	9 g. (Difco).
NaCl	75 g.
Bactoagar	15 g.
Lactose	10 g.

Dissoudre dans 1.000 cm³ d'eau distillée à pH 7. Amener à pH 7,4. Répartir et stériliser à l'autoclave à 120° pendant vingt minutes.

Elles sont portées à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre ou quarante-huit heures. Sur ce milieu les staphylocoques :

1° Ont une pigmentation intense qui s'accuse surtout lorsque l'on abandonne la culture à la température du laboratoire durant quarante-huit heures. Cette pigmentation est incomparablement supérieure à celle obtenue par culture sur les meilleurs milieux jusqu'à présent recommandés.

2° Excellant considérablement leur pouvoir coagulant sur le plasma : certaines des colonies étudiées par nous et cultivées sur milieux ordinaires ne coagulaient le plasma sanguin qu'après deux à trois heures d'étuve à 37°. Les mêmes colonies provenant du milieu de Chapman lactosé manifestaient leur pouvoir coagulant en vingt minutes.

3° Ne présentent aucune tendance à la dissociation même après des repiquages fréquents et prolongés.

L'emploi de la technique que nous venons de décrire nous a permis d'isoler, sur 38 selles d'enfants atteints de gastro-entérite, des staphylocoques pathogènes en très grande abondance dans 12 d'entre elles. De même nous étudions systématiquement à ce sujet tous les laits qui nous sont envoyés pour contrôle bactériologique. Dans bien des cas

certains d'entre eux, qui sont normaux quant aux tests bactériologiques courants, contiennent de nombreux staphylocoques pathogènes.

II. IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES ENTÉROTOXIQUES. — Parmi les staphylocoques pathogènes il est nécessaire de préciser si certains possèdent des entérotoxines. On sait que ces entérotoxines absorbées par l'homme ou par le singe produisent, quatre à huit heures après leur absorption, des phénomènes caractéristiques marqués surtout par des vomissements et une diarrhée profuse.

Dolman (7) a montré que l'entérotoxine injectée dans le péritoine d'un jeune chat produit, dans l'heure qui suit l'injection, les mêmes symptômes que chez l'homme ou chez le singe. Cette recherche est désignée sous le nom de « Kitten test » de Dolman.

Nous la pratiquons de la façon suivante :

Les colonies isolées sur Chapman lactosé sont repiquées sur bouillon nutritif ordinaire. Après cinq heures d'étuve à 37°, quelques gouttes de ce bouillon sont ensemencées en surface et en profondeur sur trois boîtes de Pétri dans lesquelles est coulé le milieu semi solide de Dolman.

Protéose peptone « Difco »	20 g. (Difco).
ClNa	5 g.

dissoudre dans 1.000 cm³ d'eau distillée additionnée de

Phosphate dipotassique	1 g.
Phosphate monopotassique	1 g.
SO ₄ Mg	0 g. 2
CaCl ₂	0 g. 1
Agar	3 g.

Le milieu doit être au pH 7,4.

Porter à l'ébullition, amener à 1 litre, autoclaver à 120° pendant trente minutes. Cette gélose est coulée en boîte de Pétri (0,5 cm³ à 1 cm³ d'épaisseur).

Les boîtes ensemencées sont mises dans un dessiccateur en atmosphère contenant 30 p. 100 de CO₂. Le tout est porté à l'étuve pendant quarante heures.

A ce moment, le contenu des boîtes est filtré sur papier-filtre, sous pression (filtre Seitz spécial) puis sur bougie Chamberland L₃. Le filtrat est mis dans une ampoule scellée et chauffée au bain-marie à 100° pendant trente minutes. L'entérotoxine est thermostable et l'on admet que le chauffage est suffisant pour détruire les autres toxines staphylococciques. L'entérotoxine conserve ensuite toutes ses propriétés lorsqu'elle est maintenue à la glacière.

On prend un chat jeune de 400 à 500 g. et on lui injecte dans le péritoine 1 cm³ de filtrat par Kg. de poids. Si le staphylocoque isolé est entérot toxique, on voit survenir, au bout d'une demi-heure, des nausées, puis, au bout d'une heure, des vomissements et une diarrhée importante. L'animal est abattu, chancelant pendant deux ou trois heures. Il se remet facilement ensuite.

L'injection aux quantités correspondantes à celles signalées ci-dessus

d'un filtrat de milieu de Dolman non ensemencé ou ensemencé avec un staphylocoque non entérotoxique ne produit l'apparition d'aucun trouble. Nous l'avons souvent vérifié.

En employant la technique que nous venons de décrire, nous avons pu isoler un staphylocoque entérotoxique dans une des 8 boîtes d'un lait concentré sucré qui avait occasionné un syndrome d'intoxication gastro-intestinale chez des nourrissons d'une localité du Nord de la France.

L'emploi des milieux hypertoniques à 75 g. pour 1.000 de NaCl permet donc l'enrichissement et l'isolement facile des staphylocoques pathogènes dans les produits où ils peuvent être rares ou dans ceux où leur culture est rendue difficile par l'abondance des germes saprophytes. De même, le « Kitten-test » de Dolman permet de préciser assez rapidement si les staphylocoques isolés sont entérotoxiques.

(Institut Pasteur, Lille.)

RECHERCHES SUR LES DESAMINASES DE *CL. BIFERMENTANS* ET DE *CL. SORDELLII*

par A. R. PRÉVOT, G. N. COHEN et B. NISMAN.

Les deux espèces *Cl. bifermentans* et *Cl. sordellii* ont été considérées comme étroitement parentes par Clark et Hall [1] et comme identiques par Stewart [2], Lillie [3], Breed, Murray et Hitchens [4]. Prévot et Cordier [5], au contraire, soutiennent la dualité de ces espèces. D'autre part, dans le but de trouver un substrat susceptible de permettre l'inhibition de l'ammoniogénèse à partir de cultures et de suspensions lavées de bactéries anaérobies, Cohen, Raynaud, Cohen-Bazire et Nisman [6] ont étudié la désamination d'une série d'acides aminés par *Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum*. Comme l'avaient vu Stickland [7] et Woods [8] pour *Cl. sporogenes*, Woods et Clifton [9] pour *Pl. tetanomorphum*, Woods et Trim [10] pour *W. perfringens*, ils ont vu que ces germes ne désaminent qu'un petit nombre d'acides aminés. Nous avons donc étudié le pouvoir désaminant de *Cl. bifermentans* et de *Cl. sordellii* sur une série d'acides aminés.

Nous avons tout d'abord utilisé les deux souches historiques de ces anaérobies : la souche « TM » du premier (isolée jadis par Tissier et Martelly) et la souche « 82 » du second (isolée par Sordelli), toutes deux par la technique des *resting bacteria* ; on prend 2 cm³ d'une solution M/10 d'un acide aminé stérilisé par filtration (M/5 dans le cas des corps racémiques), 7 cm³ de tampon phosphaté M/15 à pH 6,9 et 1 cm³ d'une suspension bactérienne dense obtenue par centrifugation d'un litre de culture de vingt-quatre heures, puis deux lavages consécutifs à l'eau physiologique stérile désaérée par ébullition, homogénéisation par agitation avec des billes de verre et remise en suspension dans 20 cm³ d'eau physiologique stérile. Les tubes sont scellés

dans le vide et agités à 37°. Après vingt-quatre heures d'incubation, les dosages d'ammoniaque sont effectués par la méthode de Raynaud et Gros [41] en utilisant l'appareil de Parnas-Wagner. Les valeurs trouvées — qui n'ont d'ailleurs de signification absolue qu'en fonction des conditions de l'expérience — sont diminuées des taux trouvés chez les témoins sans amino-acides, taux correspondants à l'ammoniaque formée par autolyse cellulaire.

RÉSULTATS. — Les amino-acides suivants ne sont pas désaminés : glycine, alanine, β -alanine, valine, leucine, isoleucine, acide aspartique, cystine, méthionine, lysine, histidine, phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Seules sont désaminées l'arginine et la sérine, dans les proportions indiquées par le tableau ci-dessous, donnant les pourcentages de désamination :

	<i>Cl. sordellii</i> 82 p. 100	<i>Cl. bifermentans</i> TM p. 100
l (+) arginine	92	107
dl-sérine	174	173

Ainsi, les deux stéréoisomères de la sérine sont désaminés. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons voulu voir si d'autres souches de *Cl. bifermentans* récemment isolées possédaient bien les caractères enzymatiques de la souche historique. Nous avons utilisé pour cela la souche « ST » isolée de la moelle osseuse d'un mouton mort d'infection indéterminée, la souche « CO 8 » isolée des boues activées de l'usine de Colombes et la souche 12.536 isolée d'un cas de gangrène gazeuse chez un blessé américain.

	St p. 100	CO 8 p. 100	12536 p. 100
l (+) arginine	48	151	167
dl-sérine	164	111	165

Donc la désamination des deux isomères de la sérine n'est pas un caractère de souche mais bien d'espèce ; on voit aussi que les groupements azotés non α -aminés de l'arginine sont susceptibles de donner de l'ammoniaque, fait déjà vu par Hills [42] avec d'autres germes.

CONCLUSIONS. — *Cl. bifermentans* et *Cl. sordellii* ne désaminent que l'arginine et la sérine. L'étude de leurs désaminases n'apporte pas un test susceptible de les différencier du point de vue de la taxonomie, mais apporte un fait nouveau quant à leur métabolisme azoté.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] CLARK et HALL. *J. Bact.*, 1937, **23**, 33.
- [3] STEWART. *J. Bact.*, 1938, **35**, 13.
- [3] LILLIE. *Publ. Health Rep.*, 1938, **53**, 113.
- [4] BREED, MURREY et HITCHENS (in 5^e édit. Bergey's Manual).
- [5] PRÉVOT et CORDIER. *Ces Annales*, 1941, **67**, 473.
- [6] COHEN, RAYNAUD, COHEN-BAZIRE et NISMAN. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947 (sous presse).
- [7] STICKLAND. *Bioch. J.*, 1934, **28**, 1746 ; 1935, **29**, 289.
- [8] WOODS. *Bioch. J.*, 1936, **30**, 1934.
- [9] WOODS et CLIFTON. *Bioch. J.*, 1937, **31**, 1774.
- [10] WOODS et TRIM. *Bioch. J.*, 1942, **36**, 501.
- [41] RAYNAUD et GROS. *Soc. Fr. Microb.*, 1947 (sous presse).
- [42] HILLS. *Bioch. J.*, 1940, **34**, 1057.

(Service de biochimie bactérienne. Institut Pasteur de Garches.)

INFLUENCE DES NITRATES SUR LA PRODUCTION DE GAZ PAR *W. PERFRINGENS*

par A. R. PRÉVOT et J. LAPLANCHE.

Au cours de recherches antérieures (1) sur la réduction des nitrates en nitrites par *W. perfringens*, il a été démontré que cette réduction ne peut pas se produire en présence de glucose, donateur d'hydrogène trop violent, mais qu'on peut l'obtenir quand on prend comme source d'hydrogène des glucides tels que le galactose ou le glycérol. En présence de glucose, il y a une destruction immédiate des nitrates au cours de laquelle le stade nitrite n'apparaît pas. C'est ainsi que la souche « Mayer » peut détruire 2 p. 1.000 de glucose en quarante-cinq minutes sans donner la moindre trace de nitrite. Redd [1944] (2) a observé le même fait qu'il interprète comme une destruction immédiate des nitrites formés. Or, les premières expériences évoquées ci-dessus avaient été faites en tubes de 14 × 180, désaérés par la pompe à vide et scellés. A l'ouverture de ces tubes il se produisit une explosion violente et nous avons pensé qu'au cours de la destruction du nitrate par *W. perfringens* en présence de glucose naissait un gaz explosif autre que H₂. C'est pour vérifier cette hypothèse que nous avons entrepris de nouvelles expériences. Comme il faut recueillir, en vue de leur analyse, des quantités importantes de gaz, nous avons abandonné le tube de 14 × 180 et utilisé la fiole d'Erlenmeyer d'un litre, dans laquelle nous réalisons le vide pour éviter la présence d'air dans les gaz recueillis. La première expérience a été faite sur bouillon VF glucosé à 1 p. 100, contenant 2 g. p. 1.000 de NO₃Na. Le volume de gaz recueilli est de 89 cm³ seule-

(1) A. R. PRÉVOT, *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **134**, 350, 353 ; *Ann. Ferment.*, 1940, **5**, 467 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 76.

(2) REDD, *J. Bact.*, 1942, **44**, 425

ment, le rapport $\text{CO}_2/\text{H}_2 = 1$ et le gaz explosif supposé correspondait à du méthane, mais n'atteignait que $4,5 \text{ cm}^3$ en volume (quantité trop faible pour l'affirmer). Espérant augmenter cette quantité trop

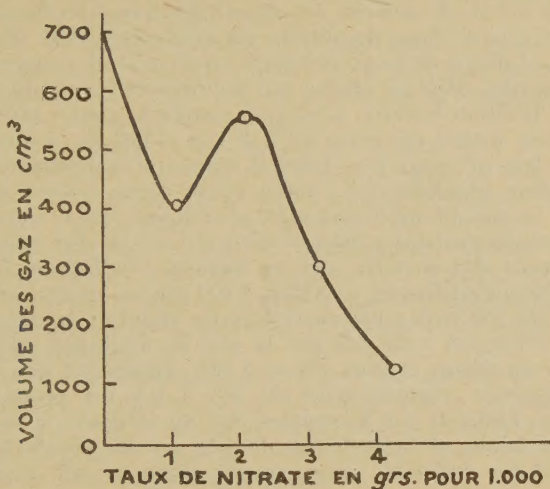


FIG. 1. — Variation du volume des gaz en fonction du taux de nitrate.

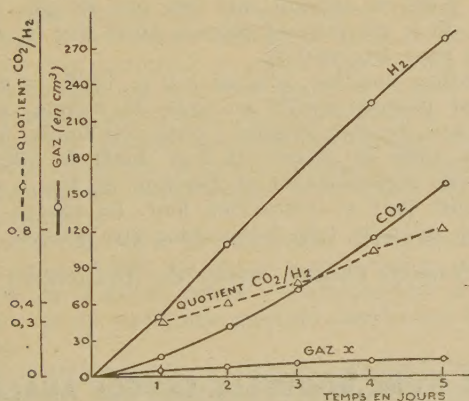


FIG. 2. — Variation du rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{H}_2}$ en fonction du temps.

faible pour tirer une conclusion certaine, nous avons doublé le taux de nitrate et observé une disparition presque totale des gaz. Ainsi le volume des gaz de fermentation est inversement proportionnel au taux de nitrate.

La deuxième série d'expérience a donc été faite avec un taux de glu-

cose diminué : 2 p. 1.000 et des quantités de nitrates allant de 0 (témoin) à 4 g. p. 1.000.

1. *Influence du taux de nitrate sur le volume des gaz produits.* — Cinq fioles contenant respectivement 2 p. 1.000 de glucose et 0, 1, 2, 3 et 4 g. de nitrate de sodium ont donné des quantités de gaz d'autant plus faibles que le taux de nitrate est plus élevé, fait qui avait été observé dès le début de la bactériologie, mais n'avait jamais été analysé quantitativement. Mais la courbe qui exprime cette variation n'est pas celle d'une fonction linéaire. C'est une courbe à ressaut exprimant une baisse brutale quand on passe de 0 à 1 p. 1.000 de nitrate, puis un relèvement très net pour 2 p. 1.000 et enfin un abaissement progressif.

Il est même probable que c'est à cause de ce ressaut que l'usage de nitrater les géloses profondes a été abandonné, car le taux de nitrate préconisé empiriquement n'est pas celui qui est le plus efficace.

II. *Influence des nitrates sur le rapport CO_2/H_2 en fonction du temps.* — Dans l'expérience n° 3 (2 p. 1.000 glucose et 2 p. 1.000 nitrate) chaque lot de 100 cm³ a été analysé et les résultats consignés dans le graphique ci-dessous : on voit par là que H_2 augmente régulièrement en fonction du temps et plus vite que CO_2 , cependant que le quotient CO_2/H_2 augmente régulièrement de 0,3 à 0,8 du premier au cinquième jour. Enfin, le gaz X, supposé être du méthane, n'atteint qu'un volume très faible, et la précision donnée par les appareils à analyse de gaz n'est pas suffisante pour pouvoir affirmer qu'il s'agit bien de méthane.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — 1° Le bouillon VF glucosé à 1 p. 100, nitraté à 2 p. 1.000 ne produit que très peu de gaz, où le quotient $\text{CO}_2/\text{H}_2 = 1$ et où le gaz explosif supposé autre que H_2 existe en quantité trop faible pour être analysé.

2° Dans le même bouillon, glucosé à 2 p. 1.000, la quantité de gaz est inversement proportionnelle au taux de nitrate, mais la courbe n'indique pas une fonction linéaire : c'est une courbe à ressaut.

3° Pour 2 p. 1.000 de glucose et 2 p. 1.000 de nitrate, le rapport CO_2/H_2 augmente régulièrement en fonction du temps et passe de 0,3 à 0,8 du premier jour au cinquième jour. Ici encore le gaz explosif inconnu est en quantité trop faible pour être analysé.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

ÉTUDE D'UNE NOUVELLE ESPÈCE ANAÉROBIE *CAPSULARIS STABILIS* n. sp.

par F. PATOCKA et A. R. PRÉVOT.

La nouvelle espèce que nous décrivons ici a été isolée en 1944 à la clinique gynécologique de l'Université Charles-IV, à Prague, dans un cas de salpingite purulente (pus de l'abcès du Douglas).

Morphologie. — Petit bâtonnet à extrémités arrondies se présentant

le plus souvent isolé, avec des formes très courtes, des formes moyennes très fréquentes et plus rarement des formes longues. Les formes moyennes mesurent $1,4 \mu$ sur $0,5 \mu$ à $0,6 \mu$. Il est entouré d'une capsule très réfringente, ne se colorant pas par les méthodes habituelles. Il est immobile, Gram-négatif, asporulé.

Physiologie. — Anaérobie strict, il pousse bien à 37° , ne résiste pas à un chauffage même très court à 70° , vit depuis plus de deux ans en collection, pousse bien à pH 7,4, ne réduit pas le rouge neutre ni la phénosafranine. Sérophile non obligatoire.

Cultures. — Gazogènes et très légèrement fétides.

En gélose profonde : colonies punctiformes ; gaz. En eau peptonée : léger trouble. En bouillon VF glucosé : trouble homogène ; gaz ; légère odeur fétide ; acidification. La gélatine est liquéfiée en vingt-quatre heures. Le lait est coagulé massivement en trois jours. Les protéines coagulées ne sont pas attaquées. Les glucides suivants sont fortement fermentés : glucose, lévulose, maltose, saccharose, galactose, lactose, arabinose, amidon, mannitol et glycérol. Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites.

Biochimie. — La fermentation du bouillon glucosé ne produit ni indol ni scatol ; l'ammoniaque y atteint 0,0204 g. p. 100 ; l'acidité volatile 0,131 g p. 100. C'est un mélange d'acides butyrique et formique (B/F = 1/2). Il produit aussi de l'acide lactique, des amines volatiles ; de l'acétone et de l'acétylméthylcarbinol.

Pouvoir pathogène. — Ayant été isolé dans un pus d'abcès de salpingite purulente, où il était associé à *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus zymogenes* et *Ristella melaninogenica*, il est vraisemblablement responsable de cette suppuration en association. Injecté au cobaye par voie sous-cutanée, il provoquait œdème et abcès, entraînant la mort en trois semaines : on retrouvait ce germe dans le sang et la rate. Mais alors que le germe isolé du sang avait gardé sa capsule et donnait des colonies muqueuses sur gélose-sang en surface (dans le vide), les germes repris de l'abcès et de la rate donnaient des colonies rugueuses, dissociation qui semble avoir été réversible, car après cultures, ces derniers ont retrouvé leur capsule. Actuellement le microbe a perdu son pouvoir pathogène expérimental.

Agglutination. — Un lapin préparé contre cette souche a donné un sérum agglutinant au 1/360. Ce sérum a agglutiné au même taux une deuxième souche de la même espèce, postérieurement isolée par hémoculture dans un cas de septicémie mortelle consécutive à une appendicite gangréneuse.

Position dans la systématique. — Bâtonnet asporulé, immobile, Gram-négatif et encapsulé, cet anaérobie appartient au genre *Capsularis* P. 1938 (1), qui jusqu'ici ne comprenait que 3 espèces : *C. zooglyformans* (Prausnitz), *C. mucosus* (Klinger) et *C. variabilis* (Distaso). Notre germe se distingue facilement des deux premières espèces en ce qu'elles sont sérophiles obligatoires, donnent des cultures visqueuses et cohérentes en bouillon, ne vivent que très peu de temps et ont des caractères cultureux nettement différents. Il se rapproche beaucoup plus de la troisième espèce, mais celle-ci est très variable, ne vit que dix jours, ne

(1) A. R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*, 1941, 56.

trouble pas le bouillon, ne fermente que le glucose, n'a aucun pouvoir pathogène, produit de l'indol, ne liquéfie pas la gélatine et ne coagule pas le lait. Il s'agit donc bien d'une espèce nouvelle qui, en raisons de ses caractères de stabilité a reçu le nom de *Capsularis stabilis*.

(Institut Pasteur et Faculté de Médecine de Prague.)

ERRATA

- P. 677. *Au lieu de* : Inoculation de la lèpre aux animaux, par M. Chaussinand, *lire* : par R. Chaussinand.
- P. 682. *Au lieu de* : La transmission en série de la lèpre humaine aux animaux n'est pas réalisable par le procédé d'Ota, par M. Chaussinand, *lire* : par R. Chaussinand.
- P. 682. Ligne 19 de l'article : La transmission de la lèpre en série... *au lieu de* : vasculaire, *lire* : vacuolaire.

Le Gérant : G. MASSON.